

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE FARMÁCIA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

**Lavado broncoalveolar: análise de perfis celulares em doenças do
interstício pulmonar**

Marisa da Cruz Catarino

LISBOA, 2013

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE FARMÁCIA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

CENTRO HOSPITALAR LISBOA NORTE, HOSPITAL DE SANTA MARIA

ORIENTAÇÃO: PROFESSORA DOUTORA MARIA LEONOR FERREIRA ESTEVÃO CORREIA

MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Marisa da Cruz Catarino

LISBOA, 2013

Agradecimentos

Ao terminar esta tese de mestrado resta-me registar os meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que, de uma maneira ou de outra, contribuíram para que se tornasse realidade:

- À Professora Doutora Leonor Correia, mesmo com uma agenda sempre tão preenchida, ter-me concedido o prazer de ser aceite como sua orientanda, por me ter transmitido os seus conhecimentos e preciosas orientações.

- À Dr^a Sara Ismail por ter aceitado este desafio pois sem ela teria sido impossível concluir este mestrado sem aparente fim à vista. Também, por ter concebido este estudo dos lavados broncoalveolares, revelando o seu interesse e motivando-me para a sua investigação.

- Ao Professor Doutor Carvalho de Sousa o meu reconhecimento pelos esclarecimentos prestados e inestimável ajuda na elaboração dos pedidos de autorização para recolha de dados, sem os quais a realização deste trabalho teria sido impossível.

- À minha colega Técnica Ana Isabel pelo constante apoio, simpatia e disponibilidade manifestada e também, por ter sido o principal “elo” de ligação com o serviço de Pneumologia. Sem a sua colaboração teria sido um caminho difícil de percorrer.

- À minha colega Técnica Susana Lobito por todas as vezes que me aliviou do trabalho e me facilitou as folgas para ter mais tempo para me poder dedicar a este trabalho.

- À Professora Doutora M^a Cecília Silva pela sua disponibilidade e ajuda na elaboração da estatística deste trabalho.

- Ao Professor Doutor Bugalho de Almeida pelos livros gentilmente oferecidos e à Dr^a Paula Monteiro pelos esclarecimentos prestados.

- Ao Técnico de anatomia patológica Pedro Henriques, do Instituto de Anatomia, por me ter ajudado e possibilitado a captação de fotografias da morfologia do LBA.

- Às minhas amigas Susana Maia e Hellen Toledo, cuja amizade nasceu por intermédio deste mestrado, por me terem acompanhado nesta jornada, e pelo apoio nos momentos de alegria e de angústia e pelo incentivo constante.

- Aos meus estimados colegas e amigos Sara Esteves, Amélia Rodrigues e Bruno Costa por terem disponibilizado parte do seu tempo com a apreciação de algumas partes desta tese.

- Aos meus pais e irmão e aos meus amigos (Adriana, Carina, Ricardo, Selma e Eugénia e Fátima) e a todos aqueles cuja atenção negligencieei e que muitas vezes remeti ao aparentemente esquecimento.

“Quem ouve, esquece

Quem vê, lembra

Quem faz aprende”

Confúcio

Resumo

A lavagem broncoalveolar é uma técnica aceita como meio complementar de diagnóstico em várias patologias do pulmão. Nas últimas três décadas, vários trabalhos confirmaram que ela reflete a celularidade existente no alvéolo e no interstício. A fim de compreender melhor a composição dos diferentes perfis celulares, que podem ser encontrados no lavado broncoalveolar e tentar apurar o interesse preditivo deste teste, na evolução e prognóstico das doenças do interstício pulmonar, foram estudadas várias doenças tais como a sarcoidose, a pneumonia, a fibrose pulmonar, a tuberculose, a alveolite, as neoplasias e o lúpus eritematoso sistêmico. Foi efetuada a determinação do número de células/mL, da % de linfócitos e macrófagos, da determinação da razão CD4/CD8 e da observação da morfologia celular, durante o período compreendido entre Março de 2010 e Março de 2011. A determinação dos perfis celulares e a observação da morfologia foram executados em citoesfregaços corados com a coloração de Leishman. A razão entre as subpopulações linfocitárias CD4 CD8 foi determinada por citometria de fluxo.

Nos doentes com sarcoidose encontraram-se diferenças estatisticamente significativas relativamente ao número de células encontrados no lavado broncoalveolar ($296,4 \times 10^6/\text{mL}$) e nº de leucócitos no sangue periférico ($7,8 \times 10^6/\text{mL}$) quando comparados com os valores de referência. As patologias que recorreram ao estudo do lavado broncoalveolar, apresentaram todas um aumento do nº de células, sendo a pneumonia a que apresentou o valor mais elevado ($830 \times 10^6/\text{mL}$).

A % de linfócitos (20,4%) e a razão CD4/CD8 (6,9) encontradas no grupo com diagnóstico de sarcoidose foram superiores aos valores normais (respectivamente 9,4% e 1,7). Também a % de macrófagos encontrada (70,6%) foi inferior aos valores referidos como normais (79). A fibrose pulmonar apresentou uma razão CD4/CD8 (0,8) inferior ao normal (6,9), com $p=0,002$.

Quando interpretado no contexto clínico e radiológico e associado a outros exames complementares de diagnóstico o lavado broncoalveolar, acompanhado da correta informação clínica e dos dados fornecidos pela citometria de fluxo e pela análise morfológica, fornece uma informação valiosa para o estabelecimento do diagnóstico das doenças do interstício pulmonar.

Abstract

Bronchoalveolar lavage is a technique accepted as a complementary diagnostic in various diseases of the lung. In the last three decades, several studies confirmed that it reflects the existing cellularity in alveolar and interstitial area. In order to better understand the composition of the different cell profiles, which can be found in bronchoalveolar lavage and try to determine the predictive interest of the test, in progress and prognosis of lung tissue diseases were studied diseases such as sarcoidosis, pneumonia, pulmonary fibrosis, tuberculosis, alveolitis, cancer and systemic lupus erythematosus. Was performed the determination of the number of cells /ml, % of lymphocytes and macrophages, determination of the CD4/CD8 ratio and the observation of cell morphology, during a period between March 2010 and March 2011. The determination of cell profiles and observation of the morphology were performed on cytospin smear stained with Leishman stain. The ratio between the sub-CD4 CD8 lymphocyte populations was determined by flow cytometry.

In patients with sarcoidosis were found statistically significant differences regarding the number of cells found in broncoalveolar lavage ($296,4 \times 10^6/\text{mL}$) and leukocytes in peripheral blood ($7,8 \times 10^6/\text{mL}$), when compared with reference values. The pathologies studied showed an increase in the number of cells, pneumonia having the highest result ($830 \times 10^6/\text{mL}$).

The % of lymphocyte (20,4%) and the CD4/CD8 ratio (6,9) found in the group with sarcoidosis were higher than normal (respectively 9,4 and 1,7%). Also found that the % of macrophage (70,6%) was lower than the values reported as normal (79). Pulmonary fibrosis showed a lower than normal CD4/CD8 ratio (0,8) with $p = 0,002$.

When interpreted in the clinical and radiological context and associated with other diagnostic exams, bronchoalveolar lavage, accompanied by the correct clinical information and data provided by flow cytometry and morphological analysis provides valuable information for establishing the diagnosis of interstitial lung diseases.

Índice de Abreviaturas

AAE - Alveolite alérgica extrínseca

Ac/s - Anticorpo/s

Ag/s - Antígeno/s

BP - Biópsia pulmonar

BT - Biópsia transbrônquica

CD - *Cluster of differentiation*

CD4 - Recetores de superfície dos linfócitos T auxiliares

CD8 - Recetores de superfície dos linfócitos T citotóxicos e supressores

CD3 - Recetores de superfície dos linfócitos T

CF - Citometria de fluxo

DIP - Doença/s do interstício pulmonar

DPD - Doença pulmonar difusa

ECA - Enzima conversora da angiotensina

FP - Fibrose pulmonar

FS - Dispersão frontal ou *foward scatter*

IL - interleucina

INF- γ - Interferão gama

IGF-1 - Fator de crescimento semelhante à insulina 1

LBA - Lavado broncoalveolar

LVBA - Lavagem broncoalveolar

NK - *Natural Killer*

MHC - Complexo major de histocompatibilidade

mL - Mililitro

PA - Proteinose alveolar

PID - Pneumonia intersticial descamativa

PII - Pneumonia intersticial idiopática

PIND - Patologia do interstício não diferenciada

PO₂ - Pressão parcial de oxigênio

PCO₂ - Pressão parcial de dióxido de carbono

PBS - Tampão de fosfatos

PDGF - Fator de crescimento derivado das plaquetas

PH - Pneumonite de hipersensibilidade

POC - Pneumonite obliterante criptogénica

RANTES - Citocinas expressas e secretadas pelas células T ativadas

RI - Resposta imunitária

RX - Radiografia ao tórax

SI - Sistema imunitário

SS - Dispersão lateral ou *side scatter*

TAC - Tomografia axial computadorizada

TCAR - Tomografia computadorizada de alta resolução

TGF- β - Fator de crescimento tumoral β

Th₁ - *T helper 1*

u-PA - Ativador do plasminogénio urinário

VIH - Vírus da imunodeficiência humana

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Causas de variabilidade de resultados e recomendações de padronização dos procedimentos do estudo do lavado broncoalveolar.....	33
Tabela 2 - Valores de contagens celulares em lavados broncoalveolares normais encontrados na literatura.	36
Tabela 3 - Valores de contagem celular diferencial do lavado broncoalveolar de indivíduos normais referidos por diferentes Autores.....	37
Tabela 4 - Classificação das doenças do interstício pulmonar quanto à sua etiologia.....	44
Tabela 5 - Algoritmo para a utilidade da análise celular do lavado broncoalveolar na avaliação das doenças do interstício pulmonar	46
Tabela 6 - Patologias em que o lavado broncoalveolar tem valor de diagnóstico (A) e funciona apenas como complemento de outros diagnósticos (B)	73
Tabela 7 - Perfis celulares do lavado broncoalveolar de doenças do interstício pulmonar	80
Tabela 8 - Espectros de excitação e de emissão de fluorocromos	82

Índice de Figuras

Figura 1 - Anatomia dos pulmões.....	16
Figura 2 - Bronquíolos e alvéolos pulmonares	18
Figura 3 - Células Clara na parede de um bronquíolo terminal.....	20
Figura 4 - Parede alveolar.....	21
Figura 5 - Pulmão humano normal	24
Figura 6 - Esquema representativo da broncofibroscopia	30
Figura 7 - Representação esquemática do processo de mistura incompleta no espaço broncoalveolar.....	35
Figura 8 - Resposta inflamatória, na sarcoidose, com formação de granulomas e subsequente resolução ou persistência da doença.	49
Figura 9 - Ultraestrutural da célula de Langerhans.....	57
Figura 10 - Proteinose alveolar: lavado broncoalveolar com aspeto opalescente.	60
Figura 11 - Pneumonite por amiadarona. Presença de macrófagos vacuolizados	66
Figura 12 - Fagocitose de fibra de asbesto por macrófago alveolar	70
Figura 13 - Estudo do lavado broncoalveolar. Sequência dos procedimentos analíticos.	76
Figura 14 - Focagem hidrodinâmica.....	83
Figura 15 - Células epiteliais brônquicas (➡), em lavado broncoalveolar, com contagem celular total de $102 \times 10^6/\text{mL}$. Ampliação de 400x (A) e ampliação 1000x (B). Coloração de Leishman.	90
Figura 16 - Situações patológicas cujos lavados broncoalveolares foram analisados.....	91
Figura 17 -Valores percentuais médios das células dos lavados broncoalveolares analisados.	91
Figura 18 - Lavado broncoalveolar de individuo normal (92 % de macrófagos), com ampliação de 400x (A) e amostra com 27% de neutrófilos e ampliação de 1000x (B). Coloração de Leishman.....	92
Figura 19 - Lavado broncoalveolar de amostra normal (91% de macrófagos) (A) e com eosinofilia (48% de eosinófilos). Eosinófilos (➡) e plasmócitos (➡) (B). Ampliações de 1000x e coloração de Leishman.....	92

- Figura 20** - Lavado broncoalveolar de individuo normal (110×10^6 células/mL) (A) e de fumador (345×10^6 células/mL) com 93% de macrófagos alveolares, mais escurecidos e com inclusões no citoplasma (B). Ampliações de 1000x e coloração de Leishman. 93
- Figura 21** - Lavado broncoalveolar com presença de ninhos de células com morfologia sugestiva de células neoplásicas. Ampliação de 1000x (A) e de 400x (B). Coloração de Leishman. 95
- Figura 22** - Linfócitos com dismorfia do núcleo (\longleftrightarrow) (celularidade total: 189×10^6 /mL) e 50% de linfócitos. Coloração de Leishman. 95
- Figura 23** - Contagem de células obtidas em lavados broncoalveolares de indivíduos normais e com doenças pulmonares. 96
- Figura 24** - Contagens celulares obtidas em lavados broncoalveolares de indivíduos normais e de doentes com patologias do interstício pulmonar 97
- Figura 25** - Contagens celulares obtidas em lavados broncoalveolares e em sangues de controles normais (CN) e indivíduos com sarcoidose (SS). 98
- Figura 26** - Percentagem de linfócitos, obtida em lavados broncoalveolares de controles normais e em doentes com sarcoidose 98
- Figura 27** - Lavado broncoalveolar de indivíduo com linfocitose (81% de linfócitos) evidenciando rosetas de linfócitos/macrófagos. Coloração de Leishman. Ampliação 1000x... 99
- Figura 28** - Macrófagos no lavado broncoalveolar de indivíduos normais e pacientes com sarcoidose 99
- Figura 29** - Razão CD4/CD8 em lavado broncoalveolar de indivíduos normais e doentes com sarcoidose. 100
- Figura 30** - Razão CD4/CD8 no lavado broncoalveolar de indivíduos com fibrose pulmonar, indivíduos normais e em doentes com sarcoidose. 101

Índice

AGRADECIMENTOS	1
RESUMO	3
ABSTRACT	4
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	5
ÍNDICE DE TABELAS	8
ÍNDICE DE FIGURAS.....	9
I. OBJETIVOS.....	13
II. INTRODUÇÃO.....	14
II.1. SISTEMA RESPIRATÓRIO.....	15
II.1.1. Estrutura e funções	15
II.1.1.1. Anatomofisiologia do pulmão	15
II.1.1.2. Vias Aéreas.....	17
II.1.2. Conceito de Pulmão Profundo.....	19
II.1.2.1. Anatomofisiologia da área de trocas gasosas	19
II.1.2.2. Células mobilizáveis	22
II.1.2.3. Hematose	22
II.1.2.4. Interstício Pulmonar	23
II.2. LAVADO BRONCOALVEOLAR	25
II.2.1. Generalidades	26
II.2.2. Procedimento Técnico	28
II.2.2.1. Vantagens e Limitações	30
II.2.2.2. Padronização	31
II.2.2.3. Volume instilado e volume recuperado	34
II.2.2.4. Contaminação brônquica.....	35
II.2.3. Perfis celulares do LBA de indivíduos normais	36
II.2.4. Interesse Clínico	38
II.3. DOENÇAS DO INTERSTÍCIO PULMONAR	38
II.3.1. Caracterização.....	38
II.3.2. Epidemiologia.....	39
II.3.3. Causas e patogenia.....	39
II.3.3.1. Inflamação intra-alveolar	40
II.3.3.2. Fibrose intra-alveolar/Colapso alveolar.....	41
II.3.4. Manifestações clínicas e diagnóstico	41
II.3.5. Tipos de doenças intersticiais	43
II.3.6. Terapêutica e prognóstico	44
II.4. VALOR DIAGNÓSTICO DO LAVADO BRONCOALVEOLAR EM DOENÇAS DO INTERSTÍCIO PULMONAR.....	45
II.4.1. Sarcoidose.....	47
II.4.1.1. Epidemiologia e etiologia.....	47
II.4.1.2. Patogenia	48
II.4.1.3. Manifestações Clínicas.....	50
II.4.1.4. Diagnóstico e prognóstico	51
II.4.1.5. Perfil celular no LBA	53
II.4.2. Pneumonite por hipersensibilidade ou alveolite alérgica extrínseca	54
II.4.3. Pneumonias eosinofílicas.....	55
II.4.4. Histiocitose X ou granulomatose pulmonar de células de Langerhans.....	56
II.4.5. Proteinose alveolar pulmonar	59
II.4.6. Fibrose pulmonar idiopática (alveolite fibrosante criptogénica).....	61
II.4.7. Colagenoses	62

II.4.7.1. Artrite reumatoide	63
II.4.7.2. Lupus eritematoso sistêmico	63
II.4.7.3. Esclerodermia.....	64
II.4.8. Doença pulmonar intersticial induzida por fármacos.....	64
II.4.9. Doenças pulmonares ocupacionais	66
II.4.10. Hemorragias pulmonares	71
II.4.11. Neoplasias Pulmonares.....	72
II.4.12. Infecções Pulmonares.....	72
III. MATERIAL E MÉTODOS	74
III.1. RECEÇÃO, ACONDICIONAMENTO E TRANSPORTE DE AMOSTRAS.....	75
III.2. CRITÉRIOS DE REJEIÇÃO DE AMOSTRAS.....	77
III.3. ASPETO MACROSCÓPICO E DETERMINAÇÃO DO VOLUME	77
III.4. CONTAGENS CELULARES.....	78
III.5. DETERMINAÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS POR CITOMETRIA DE FLUXO	81
III.5.1. Fundamento	81
III.5.2. Imunofenotipagem	84
III.5.3. Metodologia.....	85
III.6. SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS EM DOENÇAS DO INTERSTÍCIO PULMONAR	87
IV. RESULTADOS	88
IV.1. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	89
IV.2. ESTUDO DO LAVADO BRONCOALVEOLAR.....	89
IV.2.1. Patologias analisadas	89
IV.2.2. Doenças do interstício pulmonar.....	93
IV.2.2.1. Volume recuperado e células/mL obtidas	93
IV.2.2.2. Contagens celulares	94
IV.2.3. Sarcoidose.....	97
IV.2.3.1. Contagens celulares totais em lavado broncoalveolar e sangue periférico.....	97
IV.2.3.2. Linfócitos.....	98
IV.2.3.3. Macrófagos	99
IV.2.3.4. Razão CD4/CD8	100
IV.2.4. Fibrose pulmonar	100
V. DISCUSSÃO DE RESULTADOS	102
VI. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS.....	117
VII. BIBLIOGRAFIA.....	125

I. Objetivos

A fim de interpretar e compreender melhor os diferentes perfis celulares que podem ser encontrados em patologias que recorrem à análise do lavado broncoalveolar (LBA), como auxiliar de diagnóstico, estudamos esses perfis para avaliar o seu interesse preditivo na evolução e prognóstico das doenças do interstício pulmonar (DIP). O trabalho integrou dados obtidos por citometria de fluxo (CF) e resultados da análise morfológica.

Este estudo teve como objetivos apurar:

- Valores da contagem celular ($10^6/\text{mL}$) no LBA e contagem de leucócitos no sangue dos doentes com sarcoidose e comparação dos mesmos com os descritos na literatura.
- Estabelecer a contagem diferencial celular das diferentes DIP, que recorrem ao estudo do LBA como método de diagnóstico, tais como a pneumonia, as neoplasias, a tuberculose, a alveolite, o lúpus eritematoso sistémico (LES), a sarcoidose, as patologias do interstício não definidas (PIND) e a fibrose pulmonar (FP) e comparação dos resultados obtidos com valores de referência descritos na literatura.
- A correlação entre o volume recuperado de LBA (mL) e o nº de células obtidas ($10^6/\text{mL}$) e explorar o seu significado.
- A % de linfócitos obtida, em doentes com sarcoidose confirmada e sarcoidose aguardando confirmação, para entender as eventuais diferenças.
- O valor dos macrófagos (%) em indivíduos com diagnóstico de sarcoidose e sua comparação com valores de referência descritos na literatura.
- A razão CD4/CD8, em doentes com diagnóstico de sarcoidose e de FP e a sua comparação com valores de referência.
- Pretendeu-se, pelo facto de se encontrarem disponíveis vários valores referentes à análise do LBA e, também, por não haver muitos trabalhos publicados que explorem esta metodologia, interpretar os valores disponíveis, com a finalidade de estabelecer o interesse preditivo da análise deste produto biológico para o estudo das DIP.

II. Introdução

II.1. Sistema Respiratório

II.1.1. Estrutura e funções

A respiração é o processo de trocas gasosas (oxigénio e dióxido de carbono) entre o ar ambiente e as células do organismo. Este conceito, engloba os componentes pulmonares (fornecimento), circulatório (transporte) e metabólico (utilização). Do ponto de vista pneumológico, interessa considerar o pulmão não só como um órgão essencial para a respiração mas, também, como desempenhando outras funções não respiratórias, que são igualmente importantes (1).

O sistema respiratório é constituído pelos pulmões, recobertos pela pleura visceral e contidos pela parede torácica e o diafragma (principal músculo fole para a ventilação) e compreende um conjunto de estruturas cuja função principal é a realização da hematose (troca de O_2 por CO_2 que ocorre entre o ar inspirado e o sangue). Lateralmente, é limitado pela pleura e pulmões, anteriormente pelo esterno e, posteriormente, pela coluna vertebral (1).

A estrutura do aparelho respiratório comporta as fossas nasais, os seios perinasais, a faringe, a laringe, a traqueia, os brônquios e os pulmões. As estruturas acessórias englobam a pleura, o diafragma, a parede torácica, os músculos torácicos e os músculos da parede ântero-lateral do abdómen. Outros componentes da respiração englobam a ventilação, o fluxo sanguíneo e as trocas gasosas (1).

II.1.1.1. Anatomofisiologia do pulmão

A principal função fisiológica do pulmão é tornar o oxigénio disponível aos tecidos para que se processe o metabolismo e remoção do seu principal subproduto: o dióxido de carbono. Os pulmões desenvolvem esta função, movendo o ar inspirado até bem próximo do leito capilar pulmonar, para permitir a troca de gases por difusão simples (2). Os pulmões direito e esquerdo são os principais órgãos da respiração e encontram-se protegidos pela caixa torácica, com exceção do seu vértice, que se projeta sobre a base do pescoço (Fig. 1).

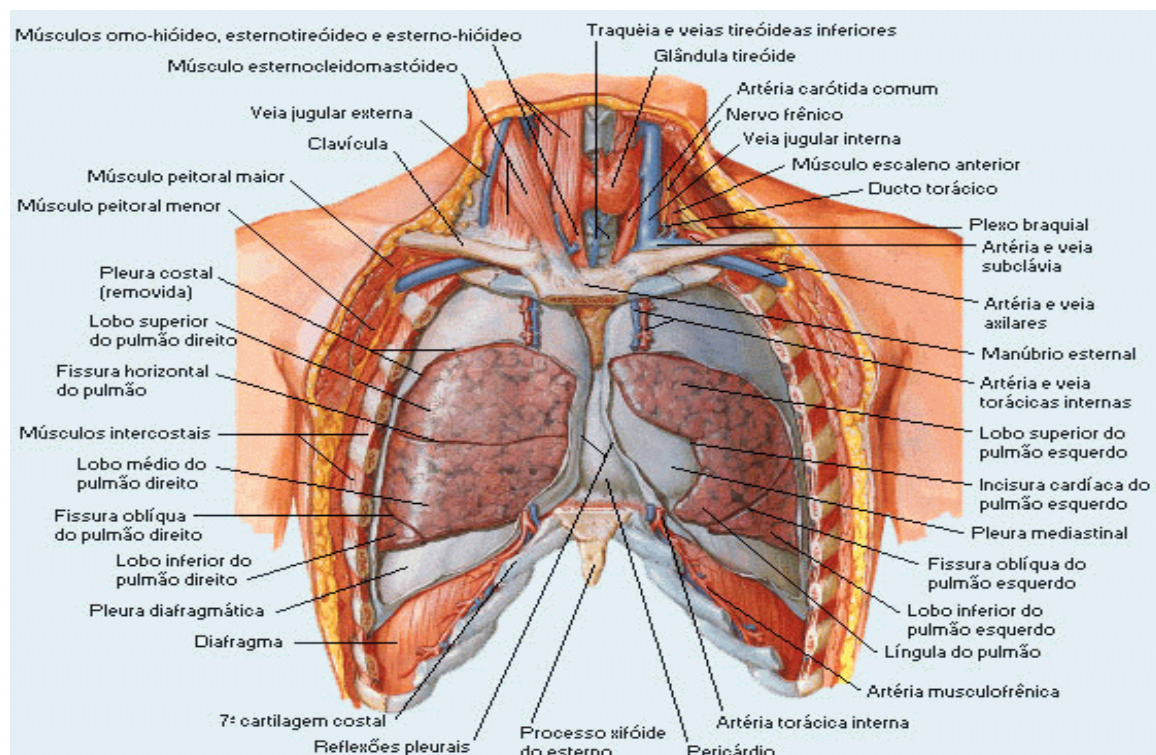


Figura 1- Anatomia dos pulmões (Retirado de Netter ,2011).

Têm a forma de cone seccionado em 2, por um plano vertical, sendo envolvidos por uma serosa (pleura) e separados pelo mediastino (2). A face externa do pulmão é convexa, adapta-se à parede lateral do tórax e é interrompida por cisuras que o dividem em lobos. Em contacto com a pleura parietal, apresenta sulcos que correspondem aos arcos costais. No pulmão esquerdo, a face externa está dividida em dois lóbulos: superior e inferior e, também, pela cisura oblíqua ou grande cisura. No pulmão direito existem duas cisuras: a grande, que separa o lobo inferior do superior e termina no bordo inferior do pulmão e a pequena que separa o lobo médio do superior. A face interna é côncava e composta por duas partes: a vertebral (posterior) em contacto com as vértebras torácicas e discos-intervertebrais, os vasos intercostais posteriores e os nervos esplâncnicos. A parte mediastínica apresenta uma concavidade mais acentuada e adaptada ao coração. Acima e atrás encontra-se o hilo triangular onde várias estruturas entram e saem do pulmão. Essas estruturas estão rodeadas por uma manga da pleura que se estende por baixo do hilo e para trás da impressão cardíaca (o ligamento pulmonar) (1,2).

O hilo/pedículo do pulmão é atravessado por diversas estruturas, como o brônquio principal, a artéria pulmonar, as duas veias pulmonares, as artérias e as veias brônquicas, o

plexo pulmonar autônomo, os vasos linfáticos, os gânglios bronco-pulmonares e tecido conjuntivo laxo. O ápex é uma extremidade superior arredondada, que ultrapassa o desfiladeiro torácico, onde contacta com a pleura cervical. A base é larga, côncava e assenta sobre cada um dos hemidiafragmas. Com base na ramificação da árvore brônquica, convencionou-se subdividir o pulmão em unidades anatómicas que compreendem os lobos, segmentos e lóbulos. Os lobos são unidades anátomo-funcionais, individualizadas a nível macroscópico pela pleura visceral, que possuem ventilação e vascularização próprias. No pulmão direito são três e no pulmão esquerdo são dois. O lobo superior esquerdo difere do direito pela adição de uma língua que ocupa a sua porção ântero-inferior e cujo nome deriva da forma do seu segmento inferior. Os segmentos são porções do pulmão ventiladas pela ramificação terminal do brônquio lobular. Cada segmento está rodeado por tecido conjuntivo em continuidade com a pleura visceral e constitui uma unidade respiratória independente. As fibras de tecido conectivo irradiam-se por dentro dos pulmões, dividindo-os em segmentos, revestindo vias respiratórias e vasos e suportando as paredes alveolares com redes fibrosas delicadas e bastante elásticas. O suporte elástico multidirecional, fornecido pela rede, permite que os pulmões se suportem a si próprios, desde os alvéolos até às vias respiratórias, e mantenham a permeabilidade dessas vias, apesar das grandes variações de volume. A artéria que irriga um segmento, tende a acompanhar o brônquio segmentar. Os lóbulos são constituídos por conjuntos de 3-5 bronquíolos terminais e correspondem às unidades fisiológicas de base ou ácinos respiratórios. Estes correspondem a um conjunto de alvéolos ventilados por um bronquíolo terminal (2).

II.1.1.2. Vias Aéreas

Apesar das diferentes estruturas comunicarem entre si como uma unidade, desde os seios perinasais e ouvido médio até aos alvéolos, situados na extremidade da árvore brônquica, há particularidades anatómicas e fisiológicas que fazem com que o aparelho respiratório se divida em vias aéreas superiores e vias aéreas inferiores. O trato respiratório superior é formado por órgãos localizados fora da caixa torácica (nariz, fossas nasais, seios perinasais, boca, faringe, laringe e parte superior da traqueia) e o inferior é formado por órgãos localizados na cavidade torácica (parte inferior da traqueia, brônquios, bronquíolos, alvéolos, pulmões, camadas da pleura e músculos que formam a cavidade torácica) (Fig.2). As vias aéreas superiores e as vias aéreas inferiores são constituídas por uma série de tubos

ramificados, que transportam o ar do ambiente, possibilitando as trocas gasosas e, com a expiração, permitem a expulsão dos gases resultantes do metabolismo (CO_2 e vapor de água) para a atmosfera. Têm, também, as funções acessórias de defesa contra agentes nocivos e infecções, bem como a de autolimpeza.

O “espaço morto anatómico” compreende o local onde as trocas gasosas não ocorrem através das membranas das vias aéreas e vai desde as fossas nasais até aos bronquíolos terminais. Cada via aérea tende a dividir-se de uma forma dicotômica assimétrica. A traqueia bifurca-se originando os brônquios principais, esquerdo e direito, e a carina corresponde ao ponto de bifurcação, suportado por uma cartilagem em forma de sela. O brônquio principal direito é mais curto, tem maior diâmetro e destaca-se da traqueia fazendo com ela um ângulo menor do que o do esquerdo, pelo que os corpos estranhos são mais frequentemente aspirados à direita (1,2).

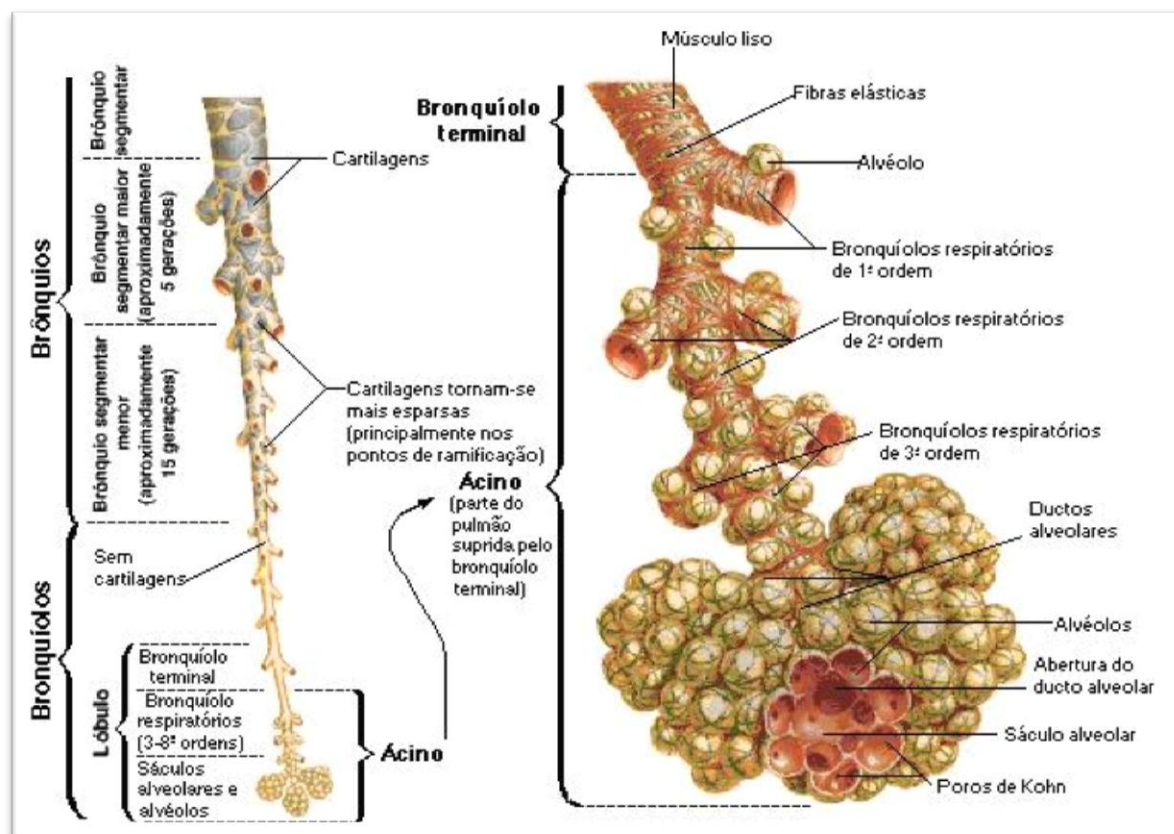


Figura 2 - Bronquíolos e alvéolos pulmonares (retirado de Netter, 2011).

Os brônquios principais entram nos pulmões na região do hilo e subdividem-se nos brônquios lobares, que originam os brônquios segmentares. Cada um deles, dirige-se a um

segmento pulmonar. Os brônquios dividem-se em tubos cada vez menores, denominados bronquíolos cujas paredes contém músculo liso e não possuem cartilagem (2).

A ramificação dos bronquíolos origina túbulos minúsculos denominados ductos alveolares. Estes terminam em estruturas microscópicas com forma de uva, designadas por *alvéolos*, que são sacos de ar minúsculos que constituem a parte final das vias respiratórias. Um capilar pulmonar envolve cada um dos alvéolos. A função dos alvéolos é trocar oxigénio por dióxido de carbono através da membrana capilar alvéolo-pulmonar (3).

II.1.2. Conceito de Pulmão Profundo

II.1.2.1. Anatomofisiologia da área de trocas gasosas

As unidades respiratórias terminais (trato respiratório inferior) apresentam aspetos morfofuncionais específicos, com início no bronquíolo terminal, e possuem capacidade de intercâmbio gasoso com a rede capilar pulmonar (2).

O conceito de pulmão profundo, embora mais alargado e menos definível morfolologicamente do que o de trato respiratório inferior, é utilizado para designar um conjunto de estruturas periféricas das vias aéreas, que abrange zonas terminais de condução e as suas ramificações (bronquíolos respiratórios, canais e sacos alveolares) bem como os alvéolos. Como, anatomicamente, a noção de pulmão profundo não corresponde a um território delimitável é o conjunto das suas funções que apoia o conceito, e que consiste na capacidade de intercâmbio gasoso, bem como na intervenção funcional ao nível da depuração de partículas inaladas, da produção de surfactante e da sua semiologia. O estudo do LBA assume um papel decisivo na avaliação deste compartimento (4).

Anatomicamente, o pulmão profundo corresponde ao conjunto de ductos alveolares e os seus alvéolos acompanhantes que têm origem nos bronquíolos respiratórios que correspondem a zonas esféricas de parênquima pulmonar, ventiladas através de um bronquíolo respiratório e perfundidas pela artéria pulmonar correspondente a cada um deles. O bronquíolo respiratório está em continuidade com o ducto alveolar e o alvéolo. As veias pulmonares localizam-se no perímetro da unidade respiratória terminal e limitam a sua estrutura, drenando o sangue de várias unidades vizinhas (5). Os bronquíolos respiratórios são os elementos mais próximos das unidades respiratórias terminais que são formadas por canais não cartilagíneos e por áreas onde ocorrem as trocas gasosas. O seu epitélio é constituído por células cubóides e apresenta alguns

cílios e microvilosidades. Dispersas pelo epitélio encontram-se células Clara (15%) cujo número se encontra diminuído nos fumadores. As principais funções das células Clara compreendem o transporte de íons e líquidos, síntese, armazenamento e secreção de lípidos, proteínas e glicoproteínas, produção de células ciliadas e de novas células de clara, bem como funções metabólicas e processamento de material xenobiótico (Fig.3) (5).

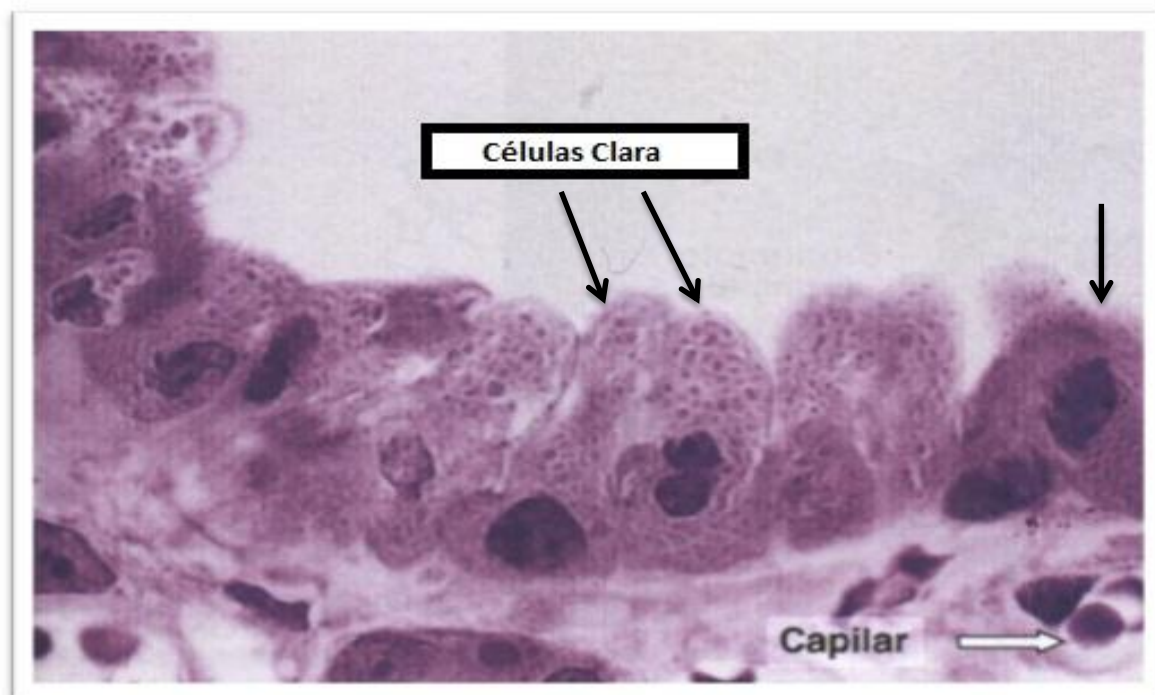


Figura 3 - Células Clara na parede de um bronquíolo terminal. (Retirado de Junqueira e Carneiro, 2004)

O epitélio alveolar compreende uma extensa área de superfície, cuja integridade é protegida por tecido conjuntivo e surfactante que é constituído principalmente por fosfolípidos e proteínas associadas, com distribuição uniforme sobre uma fase aquosa, que tem como função diminuir a tensão superficial na superfície epitelial alveolar, permitindo a expansão dos alvéolos com um consumo relativamente pequeno de energia.

Na ausência de surfactante o aumento de tensão superficial associado à redução de volume alveolar, durante a expiração, poderia fechar os alvéolos. O surfactante aumenta a estabilidade anatômica dos pulmões. A superfície alveolar está coberta por células epiteliais especializadas ou pneumócitos do tipo I, que recobrem 98% da superfície alveolar. Estes, são células grandes, cobrindo uma enorme área de superfície (cerca de $5000/\mu\text{m}^2$ por célula) e têm um citoplasma fino, que minimiza a espessura da barreira ar-sangue, e estão diretamente comprometidos na difusão gasosa. Cerca de 2% da superfície alveolar encontra-se coberta por células epiteliais

cubóides (ou pneumócitos tipo II) altamente metabólicas. Tais células secretam o surfactante e desempenham várias outras funções biológicas, tais como a regeneração do epitélio alveolar, o transporte de eletrólitos e líquidos através do epitélio (para manter os espaços alveolares secos) e a secreção de substâncias que ajudam a regular as funções imunitárias e inflamatórias do pulmão (Fig.4).

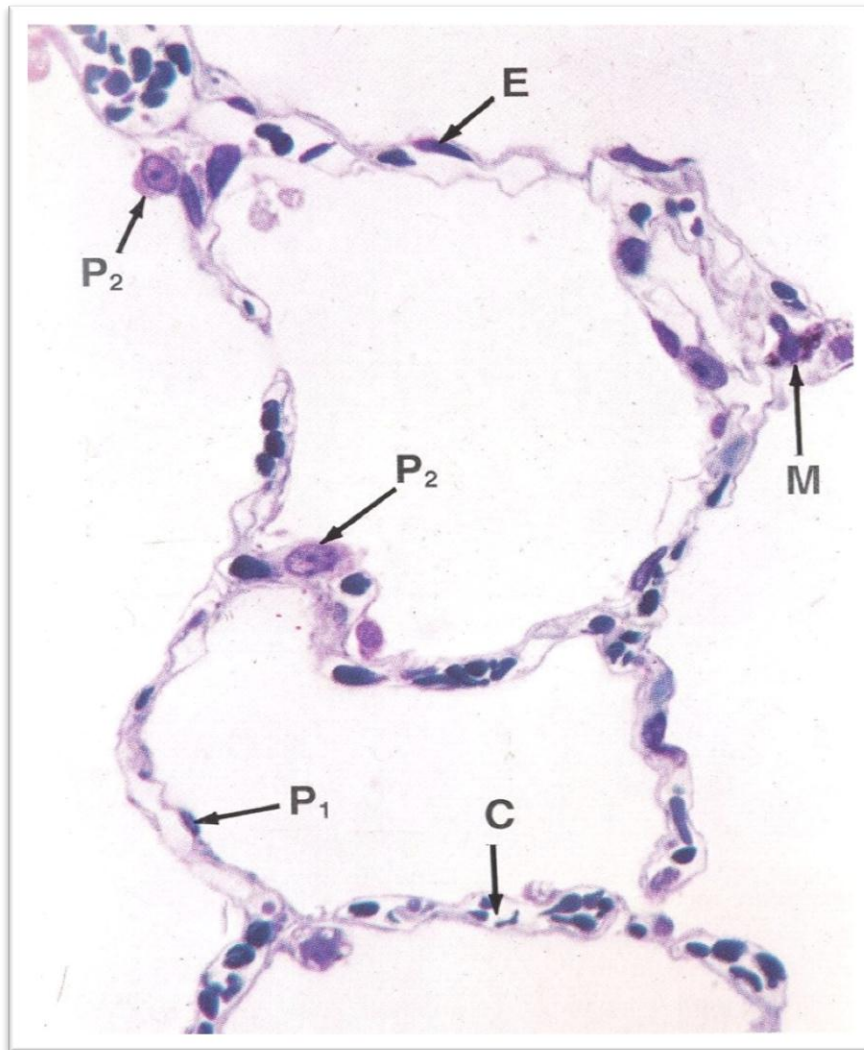


Figura 4 - Parede alveolar. C - capilares; E - núcleos de células endoteliais capilares; M - macrófagos alveolares; P1- pneumócitos do tipo I; P2 - pneumócitos do tipo II (*Retirado de Wheather, 1993*).

O revestimento epitelial das vias aéreas permite a depuração que mantém a permeabilidade dessas vias, contribuindo para que o gás respirável tenha as características indispensáveis para a hematose. O mecanismo ciliar capta as partículas orgânicas e inorgânicas (superiores a 5 μ) e

depende do teor em ATPase, enzima que transforma o ATP em ADP com libertação de energia e que é indispensável para o movimento dos cílios (4).

II.1.2.2. Células mobilizáveis

Para além das células estruturais (endoteliais, fibroblastos, musculares lisas e miofibroblastos) que integram o tecido intersticial, existe uma população de células mobilizáveis intersticiais, circulantes e endoalveolares, constituída por monócitos/macrófagos, linfócitos, polimorfonucleares neutrófilos e eosinófilos, mastócitos e plasmócitos. Todas elas alcançam os alvéolos por via circulatória, aceitando-se que possam transitar pelo interstício alveolar e que o seu número, em condições normais seja, relativamente homogéneo.

Nos territórios intersticiais e alveolares, as células mobilizáveis são suscetíveis, em condições apropriadas, de diversificação fenotípica e funcional adequada às suas intervenções específicas, como é o caso dos macrófagos alveolares (com origem nos monócitos sanguíneos) dos mastócitos, dos eosinófilos e, especialmente, dos linfócitos (4).

II.1.2.3. Hematose

As trocas gasosas ocorrem através das paredes alveolares, verificando-se uma correspondência quase igual entre a área de superfície dos capilares subjacentes e a da superfície alveolar em que ocorre uma difusão rápida de gás, mantendo-se a uniformidade da pressão parcial de oxigénio (PO_2) e a da pressão parcial de dióxido de carbono (PCO_2) (5,6).

A forma do alvéolo influencia a distribuição da perfusão pulmonar e a resistência vascular, por alterar a geometria dos vasos sanguíneos pulmonares. As trocas gasosas são dificultadas quando se acumula líquido nos alvéolos ou no interstício da parede alveolar, daí a necessidade de haver mecanismos de transporte ativo de iões através de células epiteliais alveolares, para minimizar a quantidade de líquido extravascular. A remoção de líquido dos alvéolos faz-se para compartimentos intersticiais de microvasos linfáticos. Uma vez no interstício, estes são conduzidos para o tecido conjuntivo peri-hilar ou para a pleura visceral. As vias de remoção através dos linfáticos não penetram no interstício da parede alveolar, estando localizadas no tecido conjuntivo que rodeia os bronquíolos respiratórios e terminais (2,5).

II.1.2.4. Interstício Pulmonar

O interstício pulmonar, para além da sua capacidade de suporte de estruturas diferenciadas (vias aéreas, vasos e nervos), constitui uma área de amortecimento e segurança para perturbações mecânicas, funcionais e da homeostase do aparelho respiratório. Acompanhando todas as estruturas pulmonares, o interstício pode dividir-se em subpleural, interalveolar, perilobular (no lóbulo secundário) e peribroncovascular. Pelas suas características de tecido laxo e pelo seu suporte de vias aéreas, vasos sanguíneos e linfáticos, ele facilita o deslizamento das estruturas pulmonares e dos fluídos intersticiais durante a respiração. As correlações do interstício alveolar com o meio exterior (através dos alvéolos) e com o meio interior (através dos capilares sanguíneos e dos linfáticos de origem peribronquiolar vizinha) fazem com que constitua uma zona particularmente exposta a agressões de múltiplas origens e naturezas (Fig.5).

O interstício alveolar possui recetores nervosos, constituídos por terminações mielínicas, justa-alveolares, justa-capilares e estimuláveis, no decurso de processos fisiopatológicos locais (congestão, edema e fibrose) com consequente taquipneia. No interstício alveolar existem diversos tipos celulares e estruturais (fibroblastos, miofibroblastos e células musculares lisas) e em circulação (monócitos, células dendríticas, macrófagos, linfócitos e polimorfonucleares mastócitos), que constituem um painel complexo de células estruturais e com funções imunológicas, suscetível de intervenções diferenciadas em processos defensivos, metabólicos e enzimáticos (5).

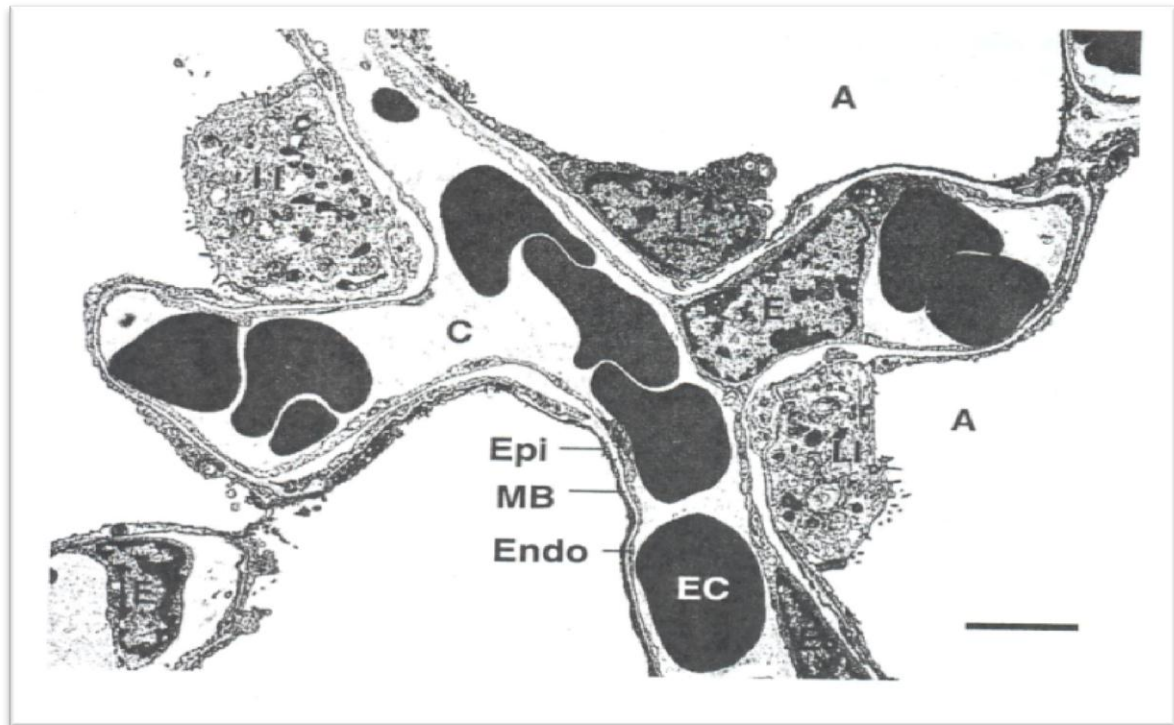


Figura 5 - Pulmão humano normal. Espaços alveolares (A).Capilares pulmonares (C). Os tecidos septais alveolares incluem pneumócitos do tipo I (I), pneumócitos do tipo II (II) e células endoteliais capilares (E). Observa-se a fina barreira de tecido septal alveolar sobre a maior parte da superfície. A barreira para a difusão de O_2 através das porções finas dos septos para os eritrócitos (EC) consiste em epitélio (Epi), membrana basal comum (MB) e endotélio (Endo) (*Adaptado de Hunninghake G, 1979*).

As relações estruturais que podem existir entre o alvéolo e o interstício compreendem a movimentação de células, o trânsito de partículas inaladas, de células fagocíticas para alcançarem os vasos linfáticos, a inter-relação imunológica entre eventuais antígenos (Ag) intra-alveolares, células ativáveis e efectoras e seus respectivos trânsitos linfáticos e sanguíneos, bem como a coexistência de processos metabólicos interativos (5).

II.2. Lavado broncoalveolar

II.2.1. Generalidades

Em 1904 o Dr. Chevalier Jackson introduziu, pela primeira vez, o broncoscópio rígido como método de remoção de secreções das vias aéreas (7). Nos 25 anos seguintes, este tipo de lavagem pulmonar foi utilizada com intuíto terapêuticos nomeadamente para o tratamento da proteinose alveolar (PA) e outras doenças respiratórias que também apresentavam uma extensa acumulação de secreções purulentas (fibrose cística, bronquite asmática crónica e pneumonia bacteriana) (7,8).

Em 1967 Shigeto Ikeda introduziu o uso do broncofibroscópio flexível e o seu impacto na prática clínica foi imediato (8,9). Tolerado por humanos, este novo instrumento de investigação permitiu que se realizasse, de forma rotineira, a análise de células e secreções das vias aéreas e de alvéolos de indivíduos normais e de pacientes com diversas doenças pulmonares (9). O broncofibroscópio era um método seguro e pouco invasivo, eliminando substancialmente a necessidade de mediastinotomia e de biópsia pulmonar (BP) de peito aberto, no diagnóstico de determinadas DIP permitindo a obtenção de amostras do pulmão *in situ*, com instilação de pequenas quantidades de solução de lavagem, para análise citológica e bacteriológica (8). A lavagem broncoalveolar (LVBA) compreende o processo de lavagem com recurso a broncofibroscópio, enquanto o líquido recuperado no final da broncofibroscopia é designado por LBA. Tornou-se possível a investigação dos fenómenos imunológicos locais e inflamatórios do trato respiratório humano. O broncofibroscópio esteve disponível nos Estados Unidos e em alguns países europeus entre 1969 e 1970, e só em 1973 o seu uso se difundiu (7). *Cantrell* e os seus colaboradores (1973) foram os primeiros utilizar o método em voluntários saudáveis, fumadores e não fumadores, e recuperaram quantidades suficientes de macrófagos alveolares, para doseamentos enzimáticos citosólicos (10). Posteriormente, surgiram novos métodos de recolha de amostras das vias respiratórias, tais como o aspirado brônquico, o escovado brônquico protegido, e as biópsias brônquica e transbrônquica (BT) para obtenção de células e material proteico e, também, substâncias solúveis dos espaços alveolares e das vias respiratórias de humanos e animais (9,11,12)

Apesar das células inflamatórias e das proteínas relacionadas estarem presentes ao longo das estruturas alveolares, as células e os componentes não celulares presentes da superfície epitelial do alvéolo são representativas do sistema imunitário (SI) e do estado inflamatório de todo o trato respiratório inferior. A árvore traqueobrônquica é uma “janela” para o SI e estado

inflamatório das estruturas alveolares (13). Foi em 1974 que, pela primeira vez, Reynolds e Newball investigaram células, proteínas e componentes do SI no LBA do trato respiratório inferior de indivíduos normais, fumadores e não fumadores, com o objetivo de estabelecer valores de referência para estes elementos. Este procedimento foi, também, aplicado a grupos de pacientes com DIP, nomeadamente FP idiopática, e pneumonite de hipersensibilidade (PH) crónica (10). O LBA tornou-se, então, parte da abordagem diagnóstica de tais patologias e um meio para a obtenção de amostras de indivíduos saudáveis e com doenças do foro pulmonar.

Em meados dos anos 70, após o aparecimento do broncofibroscópio flexível e uns anos depois de terem sido realizados os primeiros estudos em humanos, houve um grande aumento de estudos publicados sobre este tema, que se perpetuou nos 15 anos seguintes (10,11). As doenças mais estudadas foram a asma (13), as doenças ocupacionais como a asbestose, a exposição a Ags orgânicos e metais e, também, células pulmonares em doentes infetados pelo vírus da imunodeficiência humana (VIH), danos agudos no pulmão e complicações com transplantes de órgãos, tais como a medula óssea e o fígado (5,6).

As alterações observadas no LBA da sarcoidose e de outras doenças granulomatosas do pulmão são distintas, relativamente às não-granulomatosas, pelo que os estudos destas patologias confirmaram a popularidade da técnica da LVBA associada ao broncofibroscópio, facto que atraiu o interesse da comunidade científica dessa época originando a realização da primeira conferência sobre o LBA em 1976. Conforme expresso por Bergmann em 1981, o LBA era "*a new stuff in Pulmonology*" (3,5,14). Seguiram-se mais conferências sobre o tema, tendo a última ocorrido em Junho de 2011, e a próxima prevista decorrerá em 2014 (15).

Nas últimas quatro décadas, a utilização do LBA estimulou o estudo celular e imunológico das doenças pulmonares, possibilitando novos conhecimentos a nível da imunidade, inflamação, fibrinogénese, mecanismos da asma e infeções (12). Porém, este entusiasmo inicial e a grande expectativa em relação ao LBA como método de diagnóstico foi bastante precoce, pois existe uma grande quantidade de informação acumulada mas não existe, até à data, um consenso generalizado em relação à padronização da técnica, que a torne mais confiável, simples e adaptada para uso generalizado (15). Dois simpósios internacionais trouxeram de novo este tema a discussão e, só em 1999, o grupo de trabalho constituído pela Sociedade Europeia de Pneumologia reuniu esforços para criar *Guidelines* para a padronização dos procedimentos de natureza técnica associados ao LBA (16).

II.2.2. Procedimento Técnico

O LBA permite a obtenção de células e secreções provenientes dos espaços aéreos alveolares e brônquicos (17). É executado por broncofibroscopia, em que ocorre a instilação de uma solução comercial salina estéril para uso intravenoso, através de um canal do broncofibroscópio, que foi fixado no brônquio. A solução salina preenche assim os espaços alveolares, substituindo o ar (18).

Nas endoscopias brônquicas o recurso à broncoscopia rígida, sob anestesia geral, é hoje relativamente limitado, nomeadamente no domínio do diagnóstico, justificando-se a sua utilização terapêutica apenas em áreas específicas, como as da extração de corpos estranhos e da aplicação de laser.

A broncoscopia flexível ou broncofibroscopia é, pelo contrário, um exame de grande aplicação, que se pode considerar como estudo complementar de primeira escolha em diversas patologias respiratórias e, também, em situações tais como a citologia da expectoração sugestiva de neoplasia ou em indivíduos aparentemente normais mas com alto risco cancerígeno (fumadores, exposição profissional ao radão, asbesto, etc.).

A utilização do broncofibroscópio, aparelho flexível, de que existem diversos modelos, reveste-se de múltiplas vantagens relativamente ao broncoscópio rígido pois permite a observação direta das vias aéreas da 4ª à 6ª geração, é facilmente aceite pelo doente, implica apenas anestesia local (hidrocloreto de tetracaína, lidocaína) e a prévia administração de um leve sedante (Midazolan) e de Atropina. A sua introdução pode ser nasal ou oral (19).

Dado que a broncofibroscopia trás poucas complicações ao paciente, o LBA tornou-se um meio aceitável para a recuperação de células e proteínas em doentes com diversas DIP. A decisão de efetuar uma LVBA para estudo de DIP deve ser apoiada com uma suspeita clínica sugestiva, exames radiológicos e um estudo funcional completo. É importante para a interpretação dos resultados obtidos a história de tabagismo do paciente, o tipo de exposição laboral ou ambiental e os tratamentos prévios realizados (12,19,20). É fundamental a existência de uma estreita relação entre o clínico que solicita a técnica, o broncoscopista que a realiza e o responsável pelo processamento, estudo e interpretação (20).

Antes de realizar o LBA é necessário realizar-se um estudo clínico adequado que inclui:

- Realização de radiografias ao tórax (RX) pósterio-inferior e de perfil, necessárias para decidir qual o segmento mais adequado para executar o LBA (que pode ser realizado em qualquer

segmento). Se a afetação pulmonar for difusa deverá escolher-se o lóbulo médio ou a língua, uma vez que no paciente deitado de costas a anatomia favorece uma maior recuperação do líquido e menor repercussão sobre a PO_2 ;

- Tomografia axial computadorizada (TAC) que, na existência de lesões é muito útil para orientação do local mais adequado para realizar o LBA, uma vez que precisa muito bem a topografia dos locais mais afetados, que poderão ser lesões indicativas de atividade inflamatória (alveolite) ou de zonas fibrosas;

- Evitar possíveis complicações para o doente. É também aconselhável que realize exames de espirometria, gasometria, estudo da função renal e da coagulação. Estes procedimentos estão também dependentes do tipo de diagnóstico inicial;

- Posição do paciente durante a colheita. Esta é indiferente, exceto se for para fazer um diagnóstico bacteriológico. Neste caso, é preferível que seja em decúbito para diminuir o fluxo de secreções orofaríngeas para a árvore brônquica;

- Realização do LBA antes de qualquer outra técnica invasiva (BP, punção, etc.) que poderá provocar hemorragias e falsear os resultados (9,11,16,17).

Após a aplicação de anestesia local, o broncofibroscópio é inserido transnasalmente passando até ao nível da hipofaringe. Para evitar que o paciente tussa durante o procedimento, a anestesia local deve ser adequada e não supérflua. Caso contrário, poderá afetar a colheita de células, bem como a sua viabilidade e função. A LVBA também pode ser realizada com anestesia geral e em pacientes ventilados através de broncoscópio rígido ou um tubo endotraqueal (19).

No subsegmento isolado é instilada, através do seu canal interno, uma quantidade de 100 a 300 mililitros (mL) de solução salina isotónica (0.9% NaCl) à temperatura ambiente e em alíquotas de 20 a 60 ml. O líquido percorre, aproximadamente, 5 a 10 cm até atingir os alvéolos. Após cada instilação, o fluído é recuperado por aspiração com a pressão adequada e de forma a não colapsar as paredes brônquicas e é recolhido para um frasco estéril, que é mantido em gelo ou é retirado, por sucção, para uma seringa. Demasiada sucção pode provocar o colapso das paredes dos alvéolos e diminuir a viabilidade celular (19). A todos os doentes é fornecido um suplemento de oxigénio durante o procedimento e 2 horas após o mesmo, dado que a PO_2 diminui em média de 20 mmHg durante a sua execução. Os sinais vitais e ritmo cardíaco são monitorizados durante todo o período de observação (9).

Não existe um tempo determinado para a permanência do líquido no pulmão antes de ser removido. Antes de se retirar o broncoscópio, o paciente deverá tossir com o objetivo de eliminar parte da solução que tenha ficado retida. Esta fração de líquido é rejeitada e não se deverá incluir no processamento do LBA (19).

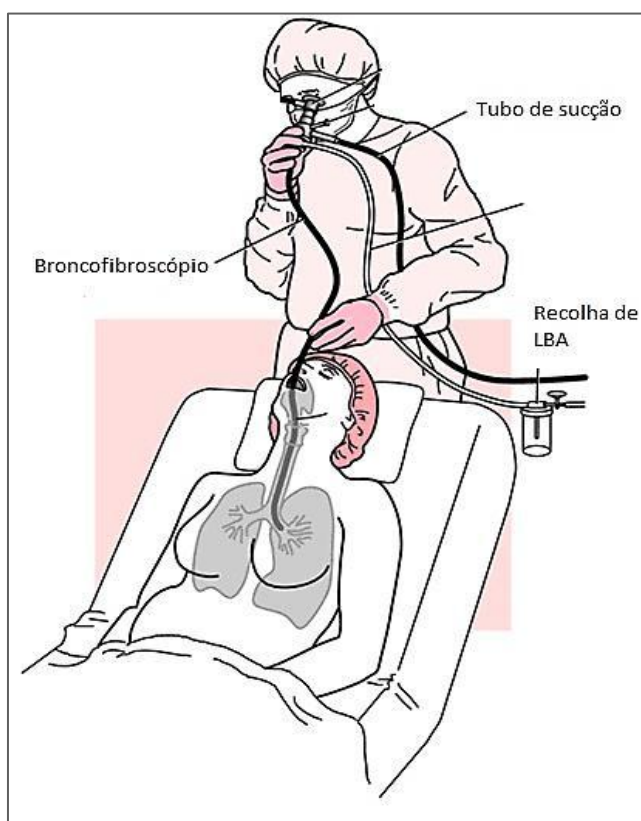


Figura 6 - Esquema representativo da broncofibroscopia. (Retirado de <http://medical dictionary com/fiberoptic>,2012)

II.2.2.1. Vantagens e Limitações

A broncofibroscopia é uma técnica sensível e bem tolerada, com escassa mortalidade e facilmente repetível, permitindo explorar uma ampla extensão de tecido pulmonar, segmento a segmento. Pode realizar-se em qualquer território pulmonar, no decorrer da mesma intervenção e apresenta várias vantagens em relação à BP (15).

É um procedimento relativamente seguro, que se pratica em apenas 10 a 15 minutos e permite recolher componentes celulares e não celulares do interstício pulmonar representativos do SI e do estado inflamatório do trato respiratório inferior. O risco deste procedimento está na execução da própria broncoscopia. Apesar das complicações serem raras, estes efeitos

colaterais apenas requerem acompanhamento e tratamento sintomático. As complicações ocorrem em cerca de 5% dos pacientes e incluem:

- Hipoxemia durante e depois do procedimento, devida à presença de fluido residual nos alvéolos;

- Pacientes cuja pressão parcial de O₂ não consiga ser mantida a 70 mmHg ou acima desta, utilizando a administração de um suplemento de oxigénio. Estes, não deverão submeter-se a este procedimento (9). Em pacientes imunocomprometidos com pneumonia deverá realizar-se gasometria para confirmar que o doente não entrará em falha respiratória durante ou depois da broncofibroscopia. Se a PO₂, mesmo com suplemento de O₂, se mantiver inferior a 65 mmHg, a intervenção deve ser executada com especial cuidado reduzindo o volume de solução salina a instilar. Se a PO₂ diminuir substancialmente com a broncofibroscopia o paciente deve ser entubado e ventilado, se necessário, efetuando uma monitorização contínua dos sinais vitais, do nível de oxigenação e do ritmo cardíaco (11).

Deve ter-se especial cuidado em pacientes com hiperirritabilidade das vias aéreas, nomeadamente asma e bronquite crónica, embora se execute com segurança, em doentes com asma estável. Da mesma forma, não se aconselha a sua aplicação em doentes com doença cardíaca instável (9).

Em alguns pacientes observa-se uma resposta febril tardia, como resultado do líquido instilado, de resolução espontânea (ocorrência em cerca de 2,5 % das manobras em volumes até 100 mL e até 10 % em volumes maiores) (8,9,16).

II.2.2.2. Padronização

Através da utilização do broncofibroscópio flexível, um método minimamente invasivo, disponível para inspeção visual, obtenção do LBA, da realização de biópsia endobrônquica e de tecido parenquimatoso de pacientes sob avaliação diagnóstica, foi possível realizar vários estudos para a monitorização da atividade da doença. A segurança da broncoscopia e do LBA foi documentada em pacientes com DIP e asma. Os dados obtidos nos estudos do LBA foram analisados e forneceram uma perspetiva sobre a imunopatogenése e os processos inflamatórios das DIP. A combinação de um método melhorado para a recuperação de amostras, diretamente do pulmão afetado, estimulou o interesse para o estudo das DIP. Isto foi particularmente evidente no final dos anos 70 e na década de 80, com a proliferação de publicações relacionadas com investigação associada à análise do LBA.

Durante alguns anos um dos principais obstáculos para uma aceitação geral do LBA como ferramenta clínica foram as disparidades existentes na aplicação da técnica e no processamento das amostras (11). O LBA foi considerado como uma biópsia líquida do pulmão e também como uma contagem de celular tais como as do no sangue ou no líquido cefalorraquidiano. Aperfeiçoamentos técnicos no procedimento e processamento continuaram a ser descritos e, alguns Autores, conseguiram obter lavagens em condições mais reprodutíveis. Foram introduzidos vários melhoramentos significativos, tais como as condições ótimas para a infusão do soro fisiológico, descritas por Pingleton e colaboradores (1983), a forma de usar (ou excluir) a primeira alíquota e a necessidade de padronizar a perda de linfócitos na distribuição de células durante a citocentrifugação (20,21).

Tornou-se evidente que as diferentes metodologias adotadas levariam a diferenças nos resultados obtidos. Embora ainda não existisse um consenso universal sobre a metodologia ideal, foram reunidos esforços para padronizar a colheita e interpretação do LBA. Em 1988, as técnicas de colheita e processamento do LBA foram padronizadas pela Sociedade Europeia de Pneumologia. Em 1989 surgiram *guidelines* sobre a aplicabilidade do LBA no diagnóstico de várias doenças do pulmão, mas só em 1999 surgiram as primeiras *guidelines* referentes à padronização dos aspectos de natureza técnica (20). Este editorial faz referência a diversas técnicas de realização do LBA, ao transporte, ao processamento, armazenamento e manipulação de amostras obtidas, que deverão ser considerados obrigatórios, dada a sua influência nos resultados obtidos pelos vários Autores. Outros grupos de trabalho também surgiram nos Estados Unidos tais como a *US BAL Cooperative* (22) e a *American Thoracic Society* em 2007 (23). De acordo com estas *guidelines*, todas as publicações deveriam especificar os diversos aspectos de natureza técnica a que obedeceram, tais como o volume de líquido instilado, o número de seringas utilizado, a percentagem de líquido recolhido e o número de células epiteliais observadas, porque só nestas circunstâncias é que se podem comparar corretamente os resultados obtidos pelos diferentes Autores.

Na tabela 1 estão representadas as diferentes causas que promovem a variabilidade dos resultados obtido no estudo do LBA e as recomendações de padronização preconizadas por três grupos de trabalho diferentes:

Tabela 1 - Causas de variabilidade de resultados e recomendações de padronização dos procedimentos do estudo do lavado broncoalveolar.

Causas de Variabilidade	US BAL Cooperative	European Respiratory Society 1999	American Thoracic Society 2007
Processo patológico	Especificar	Especificar patologia subjacente.	Especificar patologia subjacente
Pressão de aspiração	Aspirar lentamente com seringa	Manter mínima (25 a 100 mm Hg)	Manter abaixo dos 100 mm Hg
Manipulação do fluido(filtração, concentração, uso de mucolítico, etc)	–	Especificar a técnica	Não filtrar com gaze
Volume de fluido instilado	240 mL	Usar mais de 100 mL em adultos e especificar quantidade	Usar mais de 100 mL em adultos e especificar quantidade
Manipulação da primeira alíquota recuperada	Misturar todas as alíquotas	Especificar	Misturar todas as amostras, a menos que especificado
Número de seringas utilizadas	Quatro	Especificar e padronizar	Especificar e padronizar
Posição do Doente	Decúbito	–	–
Área lavada (um ou mais lobos, lobo médio, lobo inferior direito ou outro)	Lobo médio/ Língua	Especificar	Especificar
Número de áreas lavadas	Uma	Especificar	Especificar
Recuperação de fluido	Parar a lavagem, no caso da diferença entre o líquido aspirado e o instilado ser superior a 100 mL	Especificar volume e % de fluido recuperado e estabelecer critérios de percentagem de recolha mínima	Especificar
Determinações de componentes não celulares	Padronizar valores por mL de fluido recuperado e outras abordagens	Padronizar valores por mL de fluido recuperado e outras abordagens	Especificar volume e percentagem de fluido recuperado e estabelecer critérios de percentagem de recolha mínima; pelo menos 5% do volume instilado deve ser recuperado

Quando o volume do fluido recolhido for inferior a 10 mL a amostra esta não deve ser considerada representativa (devem ser recolhidos pelo menos 33% do volume instilado). Ward e colaboradores efetuaram um trabalho preliminar em 2001, usando as diferentes metodologias

utilizadas por vários Autores de diferentes países, para elaborar um relatório sobre os componentes celulares do LBA (24). Conseguiram apurar que o volume médio instilado era de 150 mL (variando de 100 a 300), as técnicas relativas ao nº de seringas e volume por seringa (5x20, 6x20, 7x20, 3x50, 3x60, 15x20), que 57% dos centros analisaram amostras (seringas) separadas e que, apenas 30% das instituições rejeitavam, a 1ª amostra. Os métodos de processamento também se revelaram muito variáveis.

II.2.2.3. Volume instilado e volume recuperado

As principais variações encontradas na obtenção de amostras de LBA devem-se fundamentalmente ao volume total instilado (que depende da tolerância do paciente e da diversidade de estudos que é necessário realizar) e à patologia subjacente. Não existe consenso acerca da padronização do volume instilado. O volume recomendado varia segundo os Autores. A maioria recomenda 100 a 240 mL (8,12,13,15,25). Em crianças, o volume instilado deve ser adaptado à idade e ao peso. Aconselha-se 1-2 mL por kg de peso e em três alíquotas. Normalmente, é recuperado entre 40 a 70% do volume instilado e a viabilidade das células é superior a 80% (15).

No LBA o volume recuperado é muito variável e depende de fatores técnicos tais como o volume instilado, a pressão de aspiração e a experiência do broncologista. A recuperação depende, também, de fatores como a idade (sendo menor nos idosos), a raça (é inferior na negra), o grau de tolerância, a deterioração funcional e os hábitos tabágicos (menor nos fumadores e patologia subjacente). Estes parâmetros condicionam a qualidade e a quantidade de fluído recuperado (26).

II.2.2.4. Contaminação brônquica

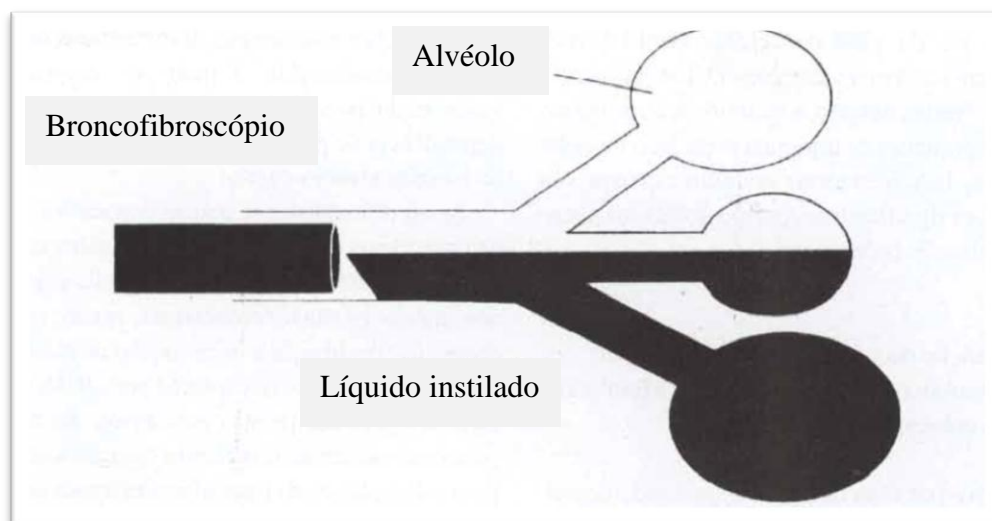


Figura 7 - Representação esquemática do processo de mistura incompleta no espaço broncoalveolar (*Retirado de Baughman, 2007*)

Os volumes instilados inferiores a 100 mL aumentam a probabilidade de contaminação brônquica. A primeira alíquota recuperada é diferente das outras, e pode alterar as contagens celulares. A 1ª amostra não é considerada representativa do conteúdo alveolar. Não há consenso sobre se a primeira amostra do lavado (proveniente essencialmente da árvore brônquica) deve ou não ser rejeitada. A lavagem nem sempre chega corretamente aos alvéolos, ocorrendo por vezes um arrastamento das secreções mais proximais para as regiões mais distais com consequente contaminação brônquica (Fig.7). A instilação de pequenos volumes faz com que haja um bom envolvimento brônquico mas, engloba uma menor área alveolar. Um maior volume instilado envolve não só a mesma área brônquica, mas também uma maior área alveolar, diluindo esta contaminação brônquica (27).

As *Guidelines* referentes à padronização dos aspetos de natureza técnica já mencionados, recomendam mesmo quantidades entre os 200 e os 240 mL. A quantificação de outros marcadores proteicos de baixa expressão alveolar, como a lactoferrina e a IgA secretória do LBA permite identificar uma eventual contaminação brônquica, caso estes se encontrem em concentrações significativas. Também uma amostra com mais de 5 % de células epiteliais não é considerada representativa do conteúdo alveolar. Isto acontece quando a técnica é executada com mais pressão (20,28).

II.2.3. Perfis celulares do LBA de indivíduos normais

Como tem vindo a ser descrito, sabe-se que o LBA explora grandes áreas do compartimento alveolar permitindo o acesso a células e a componentes não celulares do trato respiratório inferior. As alterações no líquido e na celularidade do LBA refletem mudanças patológicas no parênquima pulmonar. Neste contexto, quando o clínico decide que a informação fornecida do LBA pode ser útil para o diagnóstico, as informações obtidas devem ser analisadas cuidadosamente e os critérios de diagnóstico devem ser confiáveis (29).

Existe uma grande variabilidade nas contagens celulares diferenciais do LBA de indivíduos normais, especialmente quando consideramos fumadores e não fumadores (11). Este facto pode dever-se a fatores tais como a história de tabagismo e o volume de fluido instilado (tabelas 2 e 3) (16).

Tabela 2 - Valores de contagens celulares em lavados broncoalveolares normais encontrados na literatura.

Nº de células/mL no LBA de indivíduos normais				
Autor	Nº de amostras	Volume instilado (mL)	Volume recuperado (mL)	Celularidade total ($\times 10^3/\text{mL}$)
Yager, 1977 (30)	10	250	NR	176
Low, 1978 (31)	14	140	NR	112
Merril, 1980 (32)	24	200	NR	158
Velluti, 1984 (33)	8	150	NR	163
Pingleton, 1983 (21)	10	NR	NR	206
La Violette, 1985 (34)	42	100-300	93,5	58
Costabel, 1986 (35)	11	100,0	54	139,0
The BAL Cooperative Group Steering Committee, 1990 (22)	30	NR	NR	130 \pm 0,2
Merchant, 1992 (36)	111	100	NR	127
Drent, 1996 (37)	15	200	NR	133

NR – Não referido

Tabela 3 - Valores de contagem celular diferencial do lavado broncoalveolar de indivíduos normais referidos por diferentes Autores.

Valores de referência para a celularidade do lavado broncoalveolar no indivíduo saudável					
Autor	Nº de Amostras	% Macrófagos	%Linfócitos	%Neutrófilos	%Eosinófilos
Reynolds, 1974 (11)	5	74	15	-	-
Yager,1977 (30)	10	70	8	12	—
Low, 1978 (31)	14	94,8	3,5	1,7	—
Pingleton, 1983 (21)	10	89,9	7,7	1,7	0,6
Merril, 1980 (32)	24	88	8,7	1,5	—
Velluti, 1984 (33)	8	88,1	10,6	0.9	0,4
La Violete,1985 (34)	42	89	10	2	-
Costabel, 1986 (35)	11	92,0	7,0	1	—
Etterson, 1988 (36)	78	95,1	3,9	0,7	0,2
Merchant, 1992 (37)	111	93,2	6,1	0,5	0,1
Drent M, 1996 (38)	15	87	11	1,6	0,3
Ancochea, 1998 (19)	8	89,3	9,2	0,8	—
Danilla, 2009 (39)	55	79±8	15,7	5	0,3

II.2.4. Interesse Clínico

Após o advento da broncofibroscopia, a análise do LBA como um “exame clínico” suscitou várias questões que teriam que ser resolvidas, antes da sua aplicação em grande escala, tais como: que custos adicionais traria? Poder-se-ia simplificar o processamento laboratorial do LBA? Os resultados correlacionar-se-iam com outros indicadores de resposta ao tratamento? A análise seria reprodutível e teria especificidade suficiente para ser utilizada como um indicador preciso e sensível dos fenómenos patológicos das vias respiratórias? As células do LBA, reflexo da alveolite, estariam associadas ao conteúdo histopatológico de BT e de pulmão aberto, recolhidas durante o mesmo procedimento e nas mesmas áreas atingidas pela LVBA? Ultimamente, tem-se utilizado o LBA na investigação das doenças pulmonares, especialmente para o estudo da sua patogenia mas, também, com a intenção de complementar o diagnóstico feito por outros métodos, para identificação de fatores de prognóstico e para avaliar a eficácia terapêutica (12,40)

O LBA é útil para analisar as DIP podendo, em alguns casos, sugerir o início de uma terapêutica, desde que a clínica, os exames imagiológicos e funcionais também revelem alterações substanciais e compatíveis (41).

II.3. Doenças do interstício pulmonar

II.3.1. Caracterização

O interstício pulmonar é o espaço anatómico interposto entre o endotélio e o epitélio alveolar da matriz extracelular, do território peribronquiolar e bainhas broncoalveolares, incluindo, também, os tecidos conjuntivos que circundam os vasos sanguíneos, os vasos linfáticos e as vias aéreas (5,6).

As DIP fazem parte das doenças pulmonares difusas (DPD) e são causadas por fenómenos de agressão, com intensidade e extensão variáveis, frequentemente reiterativos, por via inalatória e/ou vascular. A estrutura-alvo, nestas doenças, é o interstício alveolar. As DIP formam um grande grupo heterogéneo de distúrbios do trato respiratório inferior, sendo consideradas conjuntamente por partilharem algumas características clínicas, radiográficas, fisiológicas, certos mecanismos patogénicos e aspetos histopatológicos.

Embora possam ocorrer alterações histopatológicas diferenciadoras, o fator comum entre as diferentes DIP é a perda disseminada das paredes alveolares e das unidades alveolocapilares funcionais, com acumulação de tecido cicatricial colagenoso. Na maioria dos casos, a rutura da arquitetura alveolar resulta de lesão inflamatória, seguida de um processo disfuncional de reparação das lesões (5).

Algumas das DIP tem uma agente causal identificado, tais como asbesto, berílio e agentes microbianos e outras resultam da hipersensibilidade desenvolvida a um medicamento ou a certas partículas orgânicas. Além disso, é comum o envolvimento do interstício pulmonar no contexto clínico das doenças sistémicas do tecido conjuntivo. A relação genética individual com o ambiente externo (agressão microbiana, tabagismo, atividade ocupacional ou exposição tóxica accidental) e com o meio interno, condicionam a expressão clínica, a evolução e o prognóstico das DIP (56). Consideradas doenças pulmonares raras, o número de casos de DIP tem vindo a aumentar, nos últimos anos, devido ao surgimento de novos agentes agressores pulmonares, tais como medicamentos, agentes citotóxicos e fatores ambientais. São um grupo bastante extenso de doenças (mais de cento e cinquenta) muitas das quais são raras (42).

II.3.2.Epidemiologia

As DIP são pouco frequentes, embora a sua incidência e prevalência reais sejam desconhecidas, pensa-se que ocorrem em cerca de 20 a 40 indivíduos em cada 100.000 (5).

II.3.3.Causas e patogenia

Cerca de 2/3 das DIP são de causa desconhecida. As restantes são, geralmente, causadas por inalação de produtos orgânicos ou inorgânicos (pneumoconiose), medicação, radioterapia, vírus, bactérias, fungos, agentes ambientais e doenças sistémicas, tais como as do tecido conjuntivo e a sarcoidose). Estes agentes causais podem ativar células imunitárias implicadas na resposta inflamatória e podem danificar diretamente as células epiteliais ou endoteliais. Neste caso, a resposta inflamatória pode ser iniciada pelo tecido lesado (5).

As DIP resultam de processos de inflamação e lesão tecidual, bem como da tentativa de reparação dos mesmos. Se os eventos associados a uma resposta inflamatória autolimitada

forem alterados, o resultado poderá consistir numa resposta inflamatória persistente com lesão contínua e comprometimento estrutural, em vez da reparação normal (5).

II.3.3.1. Inflamação intra-alveolar

lesão mais precocemente detetável nas DIP consiste no aparecimento de exsudado inflamatório no trato respiratório inferior. Macrófagos, neutrófilos e linfócitos são encontrados em número aumentado nas paredes e nos espaços aéreos dos alvéolos. O recrutamento celular pode ser dividido em quatro etapas: sequestro de células inflamatórias nos vasos pulmonares; transmigração da parede vascular; migração através da matriz extracelular, e retenção seletiva no tecido. Posteriormente ocorre libertação de diversas citocinas nas células endoteliais dos locais da inflamação (5).

As selectinas são de grande importância para a fixação dos leucócitos às células endoteliais. A capacidade de deformação dos leucócitos também é importante no sequestro de células do pulmão.

A migração das células inflamatórias nas DIP depende das citocinas e das quimiocinas. Os quimiotáticos envolvidos incluem o leucotrieno B₄, a interleucina-8 (IL-8) e o C5a (para os neutrófilos), bem como fragmentos de fibronectina, que contêm o domínio da ligação celular RGD (sequência de aminoácidos arginina-glicina-aspartato), a proteína MC-1 (MCP-1), a IL-1 e a citocina expressa e secretada pelas células T ativadas (RANTES), no caso dos linfócitos. Os macrófagos alveolares, os fibroblastos e as células epiteliais constituem importantes fontes dessas citocinas.

Quando a resposta imunitária (RI) específica é desencadeada, os linfócitos T são ativados, após o reconhecimento dos Ag associados ao complexo major de histocompatibilidade (MHC) presentes à superfície de células apresentadoras de Ag, tais como as células dendríticas e os monócitos recrutados. A RI resulta no aumento das células imunocompetentes nos tecidos pulmonares afetados (5).

A lesão das células epiteliais constitui uma característica básica das DIP. Os oxidantes, as proteases, as células imunitárias e inflamatórias, assim como as infecções virais foram sugeridas como fazendo parte dos mecanismos da lesão. A perda da barreira epitelial resulta na formação de um exsudado rico em fibrina. Ocorre redução do nº de células epiteliais, podendo haver destruição da lâmina basal alveolar. A persistência e os estados de ativação das células

inflamatórias (macrófagos, linfócitos, e leucócitos polimorfonucleares) tendem a determinar o tipo e a magnitude da lesão da parede alveolar (5,6).

II.3.3.2. Fibrose intra-alveolar/Colapso alveolar

O facto do processo de reparação resultar em fibrose ou em retorno da anatomia normal do pulmão esta irá depender, em parte, da depuração bem-sucedida do exsudado e dos resíduos interalveolares. O exsudado alveolar, em formação, contém um novo grupo de citocinas e outros mediadores, incluindo fatores de crescimento como o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), o fator de crescimento tumoral β (TGF- β), o fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), metabolitos do ácido araquidónico (produtos da 5-lipoxigenase), prostaglandinas E_2 , fibronectina, trombina e fibrinopeptídeos. As células epiteliais e os macrófagos alveolares regulam a formação e a depuração da fibrina intra-alveolar. O ativador do plasminogénio urinário (u-PA) produz plasmina, que degrada a fibrina intra-alveolar (5).

Se o exsudado intra-alveolar não for depurado, o espaço será invadido por fibroblastos e por novos vasos sanguíneos. O processo é regulado por fatores angiogénicos (IL-8) e angiostáticos como o interferão gama (INF- γ) e proteína-10 induzível por INF- γ . Sob a influência dos fatores de crescimento, as células epiteliais proliferam e produzem novas proteínas de matriz, convertendo o exsudado rico em fibrina, em cicatriz. As células epiteliais do tipo II, em proliferação, acabam por revestir a superfície do exsudado organizado. Ocorre perda de água da superfície alveolar devido à fibrose intraluminal e em consequência do colapso alveolar. A deposição de tecido conjuntivo nesses espaços aéreos colapsados resulta em perda irreversível de unidades de troca gasosa (5).

II.3.4. Manifestações clínicas e diagnóstico

As DIP podem ter manifestações respiratórias comuns, tais como a tosse seca e a dispneia de esforço, geralmente crónica e com carácter progressivo variável, que podem agravar e manifestar-se, mesmo em repouso. Outras queixas como a dor contínua no peito, a febre, o emagrecimento, e as dores articulares ou musculares, também podem estar presentes. O RX pode apresentar anomalias parenquimatosas difusas. Estando uma doença sistémica associada à

DPD, poderão existir manifestações extratorácicas sugestivas dessa entidade (artrite reumatoide, esclerose sistémica e sarcoidose) (6).

O achado auscultatório mais comum da patologia intersticial são as crepitações finas. O perfil funcional é, geralmente, o de restrição ventilatória, embora possa também observar-se limitação obstrutiva dos débitos dependentes das pequenas vias aéreas. Regista-se ainda a diminuição da capacidade de difusão do CO₂ e o aumento do gradiente alvéolo-arterial da PO₂, demonstrável no esforço ou já presente em repouso, com hipóxia e hipocapnia (6).

O diagnóstico destas doenças é, por vezes, difícil e demorado começando geralmente pela avaliação das queixas do doente e pelo exame objetivo (auscultação). É fundamental conhecer as exposições a agentes exógenos, como o uso de medicamentos e drogas potencialmente tóxicas, tanto no presente como no passado, as profissões e *hobbies* que o doente tem, ou teve, as exposições a animais, ambientais, profissionais ou domésticas. No contexto clínico deve, também, ser considerado o início agudo ou subagudo e com febre sugerindo infeção (vírus, *Pneumocystis*, *Mycoplasma*, ...), PH, pneumonia organizativa, sarcoidose, ou outros, *versus* quadros de inícios insidiosos, como acontece na FP idiopática e PH crónica. Os exames auxiliares são o passo seguinte para a confirmação diagnóstica e avaliação da gravidade da doença, o que é de máxima relevância para orientar o tratamento. Os exames mais executados são o RX, a TCAR, o estudo funcional ventilatório, a gasometria arterial, as análises sanguíneas, os estudos broncoscópicos, o LBA, as biópsias (transbrônquica e pulmonar cirúrgica) (6,42).

Os aspetos radiográficos das DIP podem ser inespecíficos ou valiosos ao reduzir o número de possibilidades diagnósticas. Normalmente, traduzem-se por opacidades micronodulares e reticulares, com uma distribuição e extensão variáveis, consoante o grau de evolução e a entidade em causa. É, também, frequente a presença de imagens de vidro despolido e, nalgumas entidades, de consolidação. A presença de opacidades em favo de mel é comum em certas DPD com fibrose estabelecida (FP idiopática e PH) (6).

As provas de função pulmonar têm maior utilidade para demonstrar a existência de anomalias fisiológicas condizentes com as DIP e para proceder ao seguimento do paciente e avaliar a resposta ao tratamento. Deve realizar-se uma broncoscopia quando as alterações tecidulares estão distribuídas no feixe broncovascular, se existe um distúrbio de enchimento alveolar ou quando há suspeita de doença infecciosa.

As alterações histológicas da sarcoidose, da carcinomatose linfangítica e da linfangioleiomiomatose são, geralmente, observadas no feixe broncovascular.

A BT pode revelar lesões características. O LBA fará diagnóstico se nele forem encontrados agentes infecciosos ou células neoplásicas sendo, também, utilizado para analisar os constituintes e produtos celulares, bem como as proteínas existentes nos espaços aéreos distais do pulmão. Após avaliação inicial fica-se com um diagnóstico presuntivo. O passo seguinte será determinar o momento apropriado para obter uma amostra de tecido para exame histopatológico sabendo que, mesmo os achados na BP são inespecíficos. Efetua-se a BP a céu aberto ou por toracoscopia quando os achados da BT forem inconclusivos, quando há dúvidas relativas ao diagnóstico e após revisão de todos os dados clínicos, radiográficos, do LBA e da BT. A taxa de mortalidade da BT a céu aberto é de menos de 1%, e a morbidade inferior a 3%. Graças a esta técnica estabelece-se um diagnóstico específico em cerca de 90% dos casos (5).

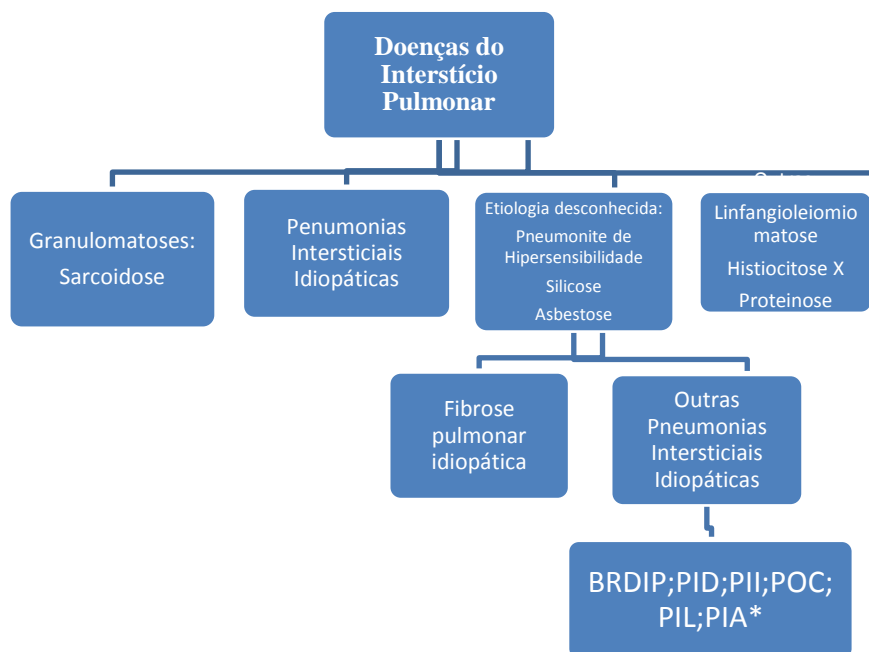
II.3.5. Tipos de doenças intersticiais

ma vez que os processos anteriormente descritos atingem as mesmas regiões pulmonares as DIP adquirem características clínicas, radiológicas e funcionais muito semelhantes, o que justifica a sua inclusão num único grupo. Várias condições podem ser classificadas com base num processo de inflamação das paredes alveolares, levando à fibrose difusa e progressiva do interstício pulmonar.

Os processos patológicos podem ser iniciados por uma grande variedade de fatores extrínsecos inalados (pneumoconiose industrial), não inalados (drogas, irradiação), e por doença intrínseca como esclerodermia e a artrite reumatoide. A classificação das doenças idiopáticas é ainda hoje feita de acordo com as *guidelines* da *American Thoracic Society/European Respiratory Society* de 2002 que as divide de acordo com a causa (conhecida ou desconhecida) e a sua evolução (tabela 4) (43).

Uma referência marcante para a compreensão das DPD é o trabalho conjunto da *American Thoracic Society* e da empresa *European Respiratory Society*, que estabelece conceitos e recomenda os critérios de diagnóstico de pneumonias intersticiais idiopáticas (PII).

Tabela 4 - Classificação das doenças do interstício pulmonar quanto à sua etiologia (Adaptado de Serober, 2010).



*BRDIP- bronquiolite respiratória com doença do interstício pulmonar; PID- pneumonia intersticial descamativa PII-pneumonia intersticial inespecífica POC- pneumonite obliterante criptogénica PIL- pneumonia intersticial linfóide PIA- pneumonia intersticial aguda

A falta de uma norma padronizada resultou em vários e confusos critérios de diagnóstico e terminologias. A TCAR separou o conceito de pneumonia intersticial usual (PIU) de outros padrões, mudando a abordagem das PII. Assim, as PII inserem-se nas DPD e englobam um conjunto de sete entidades: FP idiopática, caracterizada pelo padrão de PIU, PII, POC, PIA, bronquiolite respiratória com DIP, PID e PIL (44).

II.3.6.Terapêutica e prognóstico

Qualquer doente crónico deverá deixar de fumar, uma vez que o fumo do tabaco está associado ao risco, para várias DIP, sendo mesmo a única causa em algumas delas. Quando a causa da doença é a exposição a um agente agressor o passo mais importante é o afastamento dessa exposição. Contudo, algumas vezes, apenas se consegue que a doença estabilize. Nesses casos e nos que a causa é desconhecida ou está associada a doenças inflamatórias sistémicas é geralmente, prescrito o uso de corticosteróides (anti-inflamatórios) ou de fármacos que alteram o SI, como a azatioprina, o metotrexato ou a ciclofosfamida. Estes fármacos devem ser sempre

tomados sob controlo médico apertado e vigilância frequente, pois podem causar efeitos secundários importantes. O oxigénio domiciliário é prescrito se houver hipoxemia relevante (5,6).

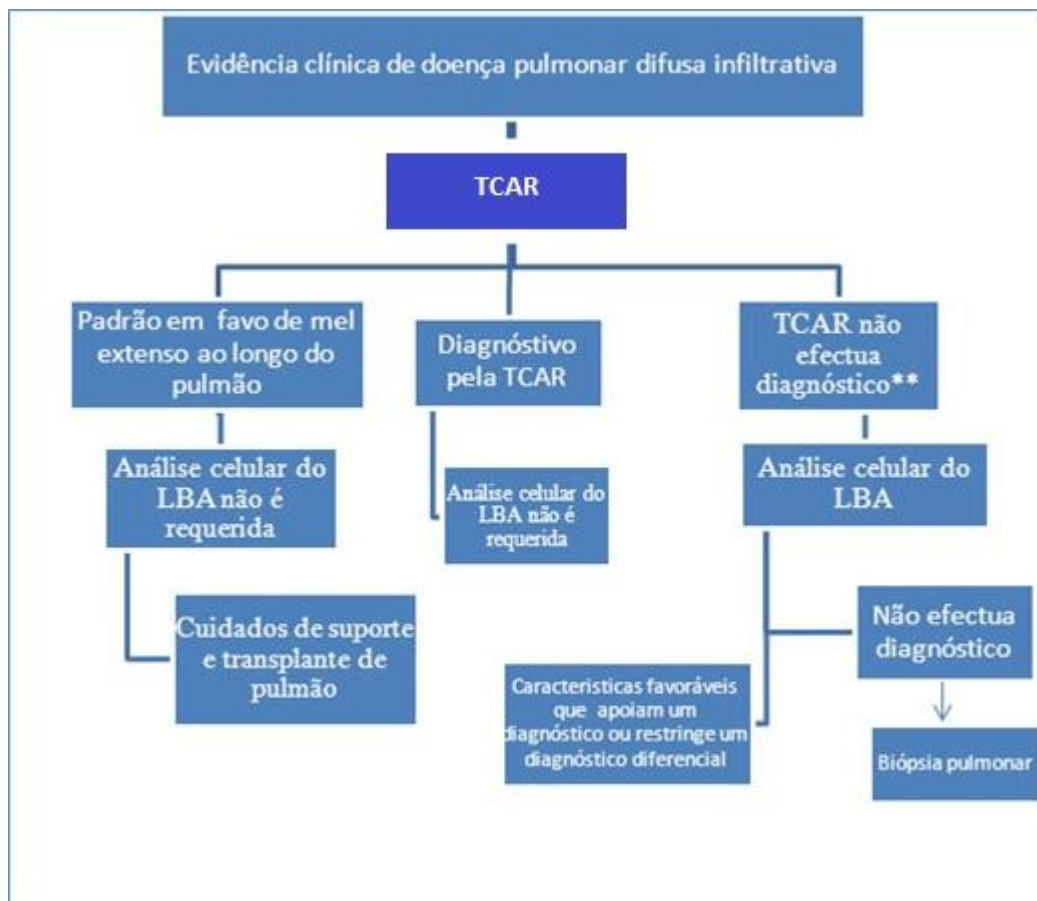
Em alguns casos, o doente pode também melhorar com reabilitação respiratória. Nas situações mais graves ou de previsível evolução desfavorável o paciente pode beneficiar de transplante pulmonar, uma terapêutica de fim de linha, que é indicada para uma pequena percentagem de casos. O transplante pulmonar é mais frequentemente realizado na FP idiopática, devido à má resposta que esta apresenta aos tratamentos e à sua rápida evolução. É recomendado a estes doentes que participem em estudos internacionais para aplicação de novos fármacos, eventualmente mais eficazes num futuro próximo (6).

O prognóstico das DIP é muito variável sendo que em alguns casos a doença pode regredir espontaneamente com o afastamento da exposição causal, embora alguns doentes desenvolvam queixas graves, com limitações importantes na vida quotidiana. É muito importante os pacientes com DIP discutirem o seu prognóstico com o médico assistente. As doenças mais agressivas devem ser alvo de uma atenção especial de forma a evitar ou atenuar as manifestações mais graves e a morte (5).

II.4. Valor diagnóstico do lavado broncoalveolar em doenças do interstício pulmonar

Existe uma grande variedade de estudos que podem ser realizados no LBA. Em pacientes com suspeita de DIP os estudos com valor diagnóstico que nele se realizam são contagem diferencial de células, estudos microbiológicos e citopatológicos. O objetivo da realização da contagem diferencial no LBA de um doente com suspeita de DIP é que a identificação ou exclusão de um padrão celular predominantemente inflamatório (linfócitos, eosinófilos aumentados e /ou neutrófilos) pode apoiar um tipo específico de DPI ou ajudar a estreitar o diagnóstico diferencial, quando considerado nos contextos clínico e radiológico. O predomínio de células inflamatórias específicas no LBA está correlacionado como o aumento da probabilidade de certos tipos de DIP. Estes, incluem eosinofilia pronunciada no LBA da pneumonia eosinofílica (PE), reações a fármacos, linfocitose na sarcoidose, PH, reações pneumotóxicas, ou PII. Um algoritmo para análise celular usando LBA de pacientes com suspeita de DIP é sugerido (Tabela 5). Visualiza-se facilmente qual a ponderação que é dada ao LBA em cada situação (45):

Tabela 5 - Algoritmo para a utilidade da análise celular do lavado broncoalveolar na avaliação das doenças do interstício pulmonar (*adaptado de Meyer, 2012*)



TCAR - tomografia axial computadorizada de alta resolução.

A TCAR pode não ser necessária em todos os casos, se os achados do RX ao tórax são típicos/diagnósticos de DIP específicas e se enquadram em outros dados clínicos. Doenças infecciosas e malignas devem ser excluídas como requerido pelas características clínicas

Os dados do LBA têm valor diagnóstico em DPD comuns e raras (pneumonias eosinofílica (PE), histiocitose X/granulomatose pulmonar de células Langerhans, PA, linfoma pulmonar, linfangite carcinomatosa e pneumonite lipóide) (46).

II.4.1.Sarcoidose

A primeira descrição de sarcoidose remonta a 1877 quando Jonathan Hutchinson referiu um caso de lesões cutâneas múltiplas das mãos e pés, de cor purpúrea, com dois anos de evolução. O termo sarcoidose foi depois utilizado pelo norueguês dermatologista Caesar Boeck em 1899 para descrever as características clínicas desta doença granulomatosa. A palavra sarcoidose deriva das palavras gregas “*sark*” e “*oid*” que significam “condição” “carnuda” respetivamente. Estas lesões são granulomas não caseosos e constituem uma das características da sarcoidose que é uma doença multissistémica de causa desconhecida e que se apresenta com linfadenopatia hilar bilateral, infiltrado pulmonar, lesões (oculares e pele) podendo, também, envolver outros órgãos. A sarcoidose é, atualmente, a causa mais comum de DIP em muitos países ocidentais (47,48).

II.4.1.1. Epidemiologia e etiologia

A sarcoidose afeta principalmente jovens e adultos de meia-idade, e a sua incidência varia de acordo com a idade, sexo, raça, origem geográfica e é de, sensivelmente, 16,5/100.000 nos homens e de 19/100.000 nas mulheres (49).

A etiologia da sarcoidose ainda é desconhecida. O conceito geral é de que a doença emergiu a partir da exposição de indivíduos geneticamente suscetíveis a certos agentes ambientais (50). Atualmente, sabe-se que as exposições ambientais aos inseticidas e fungos filamentosos estão associadas a maior risco e que os profissionais de saúde parecem ter um risco mais elevado.

Alguns Autores são apologistas de que a sarcoidose não é decorrente de um único agente mas que representa a resposta de um determinado hospedeiro a múltiplos agentes. A predisposição genética pode explicar a heterogeneidade na apresentação da doença e gravidade existente entre diferentes grupos étnicos e raciais.

Há estudos que referem que os haplotipos HLA específicos de famílias afetadas sugerem que o modo de transmissão da sarcoidose é poligénico, sendo mais frequente nos genótipos de classe I (HLA-A1 e B8) e da classe II (HLA-DR3). É provável que os hospedeiros geneticamente predispostos à doença, quando expostos a Ags desencadeiem uma RI celular exagerada, levando à formação de granulomas. Foi demonstrado que o *locus* do HLA está intimamente ligado à RI. Indivíduos com uma RI alterada têm risco aumentado de infeção viral

e a persistência de Ag virais específicos pode predispor indivíduos suscetíveis a desenvolver a doença (51,52).

Vários agentes infecciosos tais como os vírus têm sido apontados como possíveis causas de sarcoidose (simples, Epstein-Barr e retrovírus) e, também bactérias (*propionibacterium acnes*, *Borrelia burgdorferi*, *Mycoplasma*, *Chlamydia*, *Nocardia*) e as micobactérias. Estudos serológicos detetaram um aumento de anticorpos (Acs), no soro, contra alguns desses agentes mas que, provavelmente, refletem um epifenômeno devido ao aumento da produção de imunoglobulinas policlonais por plasmócitos, em vez de uma resposta específica a um agente causador. Infelizmente, mesmo com o aparecimento de técnicas moleculares, não há prova definitiva de um agente infeccioso específico etiológico na gênese da sarcoidose (50).

II.4.1.2. Patogenia

A sarcoidose caracteriza-se por anomalias de resposta a um Ag. Extensos estudos realizados no pulmão e utilizando o LBA, demonstraram que nestas anomalias imunológicas ocorre uma resposta inflamatória inicial de influxo e acumulação de células inflamatórias CD4+, com produção de citocinas e consistente com uma RI tipo T helper 1 (Th₁). Além disso, há uma acumulação de monócitos ativados, que mostram maior expressão de MHC classe II e de moléculas co-estimuladoras (50).

A sarcoidose evolui ao longo de três estádios: inflamação difusa (alveolite), proliferação celular que leva à formação de células epitelióides (granuloma) e hipertrofia das células epitelióides com formação de agregados celulares localizados (fibrose). As citocinas e outros mediadores, produzidos por essas células, contribuem para a formação do granuloma. Os macrófagos alveolares reconhecem e apresentam, via HLA-II, o Ag desconhecido à célula Th₁ CD4+, que induz a inflamação granulomatosa com a produção de TNF- γ e de IL-2, que recrutam monócitos e macrófagos para o local da doença ativa.

Os macrófagos ativados produzem IL-12, IL-15, TNF α , IL-6 e outras citocinas importantes na ativação, proliferação e recrutamento de mais linfócitos e monócitos, que contribuirão para a formação do granuloma. Esta chamada de células pode explicar o porquê da diminuição das células Th₁ em circulação. A IL-2 aumenta os níveis dos clones de células Th₁ e o IFN- γ ativa macrófagos e promove a sua transformação em células gigantes importantes na formação do granuloma. Os macrófagos alveolares libertam também fibronectina e fator de crescimento dos fibroblastos necessários ao processo de chamada, fixação e proliferação destas

células. Os macrófagos ativados e os linfócitos Th₁ em conjunto com fibroblastos modulam a formação do granuloma sob a influência de citocinas produzidas localmente. A estimulação persistente pelo Ag desconhecido resulta na desregulação de citocinas e possivelmente das respostas auto-imunes das células T (Fig. 8) (5, 50,53-55).

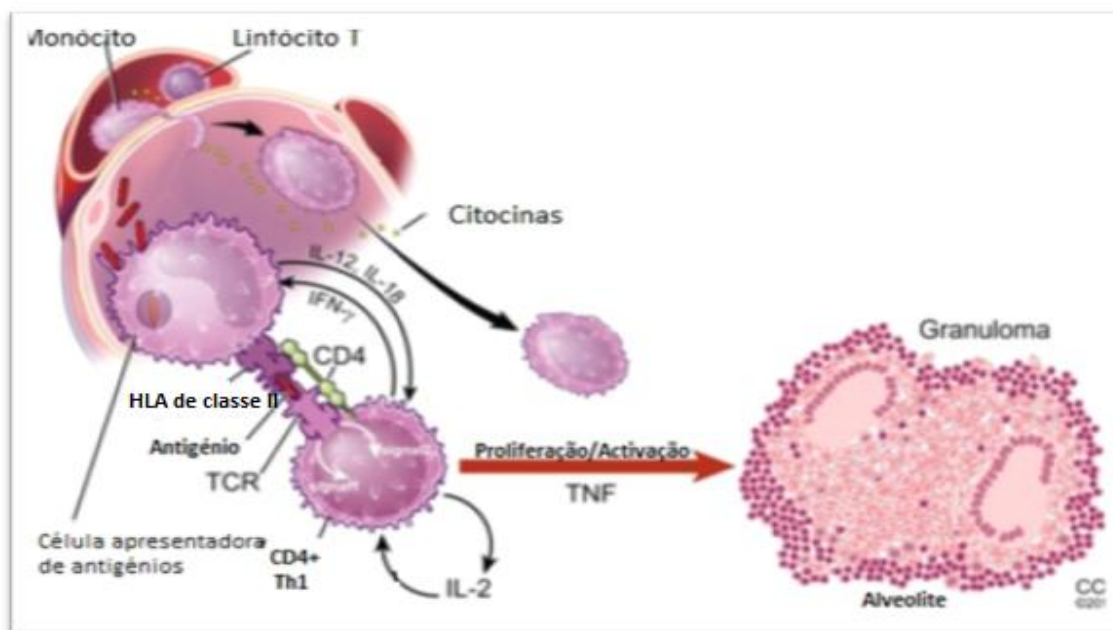


Figura 8 - Resposta inflamatória, na sarcoidose, com formação de granulomas e subsequente resolução ou persistência da doença. TCR - Receptor da célula T; Th1- Linfócito T auxiliar 1; TNF - Fator de necrose tumoral; IL - interleucina; CD4 - linfócito T CD4 (Retirado de Drent ,2007).

Se não for tratada, a estimulação crônica pelo Ag e a produção contínua de citocinas em conjunto com a produção desregulada do TGF- β e de outras citocinas pró-fibróticas, resultam em alteração tecidual e conduzem, irreversivelmente à fibrose (123,125).

O granuloma contém fibras de reticulina que são produzidas pelas células epitelióides. Com a sua formação, o estroma do tecido circundante é empurrado para a periferia através de uma cápsula de compressão concêntrica que, mais tarde, se torna espessada e hialina quando ocorre fibrose da lesão (126).

A resposta granulomatosa da sarcoidose pode desaparecer com ou sem terapia. Em cerca de 20% dos pacientes, instala-se uma forma crônica da doença associada à secreção de altos níveis de IL-18. Esta tem um papel importante na resposta Th₁ pois, em sinergia com a IL-12, aumenta a produção de INF- γ (54,56)

Há estudos que relatam que, nos pacientes com sarcoidose crónica são libertadas, quantidades excessivas de TNF nas áreas de inflamação. Por vezes, é difícil determinar precocemente o resultado clínico definitivo da sarcoidose. A síndrome de Löfgren é a forma mais frequente de sarcoidose aguda e consiste em eritema nodoso, adenopatia hilar no RX, e uveíte. Esta síndrome está associada a um bom prognóstico, com mais de 90% dos pacientes conseguindo uma resolução da doença no decorrer de dois anos. Estudos recentes demonstraram que o HLA-DQB1*03 está altamente associado à síndrome de Löfgren. Em contrapartida, os pacientes com a condição cutânea deformante lúpus pérmio (lesão de pele característica da sarcoidose crónica) ou com acometimento cardíaco ou neurológico raramente conseguem a remissão da doença (5, 57).

II.4.1.3. Manifestações Clínicas

No que concerne à sintomatologia, são comuns sintomas respiratórios como a tosse seca, presente em 30% dos doentes, a localização extratorácica dos granulomas (nos gânglios linfáticos, nos olhos ou na pele) os sintomas constitucionais (fadiga em 27% dos doentes, perda de peso em 28%, febre e suores noturnos) e o eritema nodoso (em 3 a 44% dos doentes). A sarcoidose aguda que tem um início abrupto e é mais frequente em caucasianos do que em afro-americanos. Pode apresentar-se como síndrome de Löfgren com adenopatia hilar bilateral, artrite no tornozelo, eritema nodoso e, frequentemente, sintomas constitucionais inespecíficos como febre, mialgia, mal-estar e perda de peso. O prognóstico é bom e a remissão espontânea ocorre geralmente dentro de dois anos, sendo muito raras as recaídas (57).

A sarcoidose crónica tem um início insidioso e está muitas vezes relacionada com infiltrado pulmonar, tendo como sintomas a tosse e dispneia, que predominam. Os sintomas constitucionais são muito mais raros do que na forma aguda. A sarcoidose crónica é mais frequente, de resolução menos provável e com uma duração mais prolongada do que a forma aguda (50).

Os órgãos mais frequentemente atingidos na sarcoidose são os pulmões, a pele e os olhos. O pulmão constitui o órgão de eleição, não apenas face ao seu frequente envolvimento em termos de patologia sistémica mas, também, pela sua acessibilidade, que possibilita vias de estudo importantes (imagiologia, LBA, exploração funcional respiratória, histopatologia) (57).

A lesão pulmonar ocorre em mais de 90% dos pacientes com sarcoidose. O método mais usado para identificar a doença pulmonar ainda é o RX. A TAC não costuma ser

considerada como instrumento de monitorização em pacientes com sarcoidose. Apesar de a TAC ser mais sensível, o sistema de *Scores* padronizado descrito por *Scadding* em 1961, para o RX, continua a ser o método preferido para caracterizar o acometimento torácico e compreende 4 estádios (5,58):

- Estádio 0: 5% a 10% dos doentes mostram RX normal, com ou sem alterações nos testes de função pulmonar. Podem ainda apresentar granulomas inflamatórios à mediastinoscopia e na BP.
- Estádio 1: mais de 50% dos pacientes apresentam linfadenopatia hilar bilateral. Pode associar-se eritema nodoso e uveíte.
- Estádio 2: em 25 a 30% dos pacientes são encontradas linfadenopatias bilaterais associadas à infiltração parenquimatosa (uni ou bilateral, sendo a última mais comum), podendo ocorrer imagens de acometimento alveolar. As manifestações clínicas mais comuns são febre, perda de peso e dispneia. Alguns doentes apresentam-se assintomáticos.
- Estádio 3: aproximadamente 15% dos pacientes apresentam infiltração parenquimatosa, sem adenopatia hilar. O padrão de acometimento varia entre reticulonodular (mais comum), acinar ou alveolar e nodular.
- Estádio 4: FP irreversível, retração pulmonar e enfisema.

Na sarcoidose, PH, silicose e histiocitose X os infiltrados atingem principalmente o lobo superior. Nas doenças infecciosas como a tuberculose e a pneumonia por *pneumocystis*, frequentemente, há atingimento do lobo superior (5).

II.4.1.4. Diagnóstico e prognóstico

Para o diagnóstico de sarcoidose é necessária uma história clínica compatível, a confirmação histológica de granulomas não caseosos e a exclusão de outras doenças capazes de produzir um quadro clínico ou histológico semelhante (56).

Uma vez que a causa de sarcoidose é desconhecida o diagnóstico não pode ser feito com 100% de certeza, por isso, é essencial que os achados clínicos e radiológicos de granulomas epitelióides sem caseificação num ou mais órgãos sejam apoiados pela evidência histológica de granulomas. A BP é o método de diagnóstico mais rentável, já que o pulmão é o órgão mais

frequentemente envolvido e em que é possível encontrar granulomas mesmo no estágio 1 da doença. Deste modo, em 60 a 90% dos doentes com sarcoidose a BP é conclusiva. Não obstante, o diagnóstico pode ser feito com uma certeza razoável, com base na história clínica e nas características físicas, juntamente com achados laboratoriais sugestivos (5,53).

Um possível diagnóstico de sarcoidose tem como base duas situações: biópsia que revela um granuloma sem caseação num órgão pulmonar ou extrapulmonar e presença de sinais ou de sintomas sugestivos de sarcoidose, como adenopatia bilateral (pode estar presente num paciente assintomático, com uveíte ou erupção característica).

A sarcoidose pulmonar isolada raramente é diagnosticada pela história ou exame físico, pois a maioria dos pacientes apresentam sintomas gerais de tosse, falta de ar, sensação de aperto, peso, ou dor no peito ou sintomas gerais de mal-estar, fadiga, dores nas articulações, e febre. Raramente ocorrem de crepitações finas, que podem sugerir FP. Ocasionalmente, as vias aéreas estão obstruídas e com sibilos à auscultação. O envolvimento do parênquima pulmonar apresenta-se caracteristicamente como inflamatório, com infiltração difusa e silenciosa (59).

Devido à alta taxa de acometimento pulmonar pode ser mais fácil avaliar o pulmão pela broncoscopia. Durante esse exame, pode ser realizada uma BT, biópsia brônquica ou expirado, por agulha transbrônquica, de um linfonodo mediastinal com volume aumentado. Se a biópsia revelar granulomas, deve ser excluído um diagnóstico alternativo, como infecção ou malignidade. Para os pacientes com patologia negativa, os testes de apoio positivos podem fazer aumentar a probabilidade de diagnóstico da sarcoidose (126).

Para um diagnóstico de exclusões são essenciais os dados da anamnese, a análise dos órgãos eventualmente envolvidos, os sinais clínicos, a análise do LBA, a cintigrafia pelo Gálio ⁶⁷, a reação de Kvein Siltzbach, os testes de função respiratória, o doseamento de enzima conversora da angiotensina (ECA) e o despiste de lesões noutros órgãos (126).

As provas de função respiratória permitem avaliar a evolução da doença, e as alterações funcionais encontradas podem ter padrão restritivo ou obstrutivo.

Existe uma correlação imprecisa entre a TAC e os parâmetros fisiológicos, e a realização das provas funcionais respiratórias. É essencial aferir a extensão e o grau das alterações funcionais pulmonares.

A ECA está aumentada em cerca de 60% dos casos de sarcoidose tendo um valor de diagnóstico e prognóstico limitado, embora seja muito útil na monitorização da terapêutica (126). Uma cintigrafia com Gálio⁶⁷ positiva poderá confirmar o diagnóstico, se for observada

atividade aumentada nas parótidas e glândulas lacrimais (*sinhal panda*), ou nas áreas paratraqueal direita e hilar esquerda (*sinhal lambda*). Em algumas circunstâncias, a cintigrafia com Gálio⁶⁷ é importante para determinar os locais mais indicados para a realização de biópsia.

O LBA deve ser realizado com frequência durante a broncoscopia. Apesar da confirmação de sarcoidose o doente deve ser seguido para: avaliação da extensão e gravidade do acometimento de outros órgãos, acompanhamento da estabilização/progressão da doença e determinação da eficácia do tratamento (56,59).

Para a maioria dos pacientes, a manifestação inicial da doença é observada durante a fase granulomatosa. Muitas vezes a doença regride ao longo de um período de dois a cinco anos, admitindo que tais pacientes sofrem de uma sarcoidose aguda auto-limitante. Por outro lado, existe uma forma da doença que não regride durante o referido período. Estes pacientes crónicos podem ser identificados no momento da apresentação por manifestarem alguns fatores de risco, tais como a fibrose no RX, a presença de lúpus pérmio, quistos ósseos, doenças cardíacas ou neurológicas (com exceção da paralisia isolada do 7º nervo) e cálculos renais decorrentes de hipercalcúria.

Estudos recentes indicam que os pacientes que necessitam de glucocorticoides nos primeiros seis meses, após apresentação, comportam uma probabilidade superior a 50% de virem a ter doença crónica (5).

II.4.1.5. Perfil celular no LBA

O estudo do LBA permitiu uma melhor compreensão da resposta inflamatória que ocorre na sarcoidose. A abordagem do doente é complexa. O diagnóstico da doença tem como base 3 critérios: história clínica e RX compatíveis, evidência histológica de granulomas não caseosos e exclusão de outras doenças que possam ter um perfil histopatológico semelhante.

Não existe um único exame que seja específico de diagnóstico de sarcoidose. A presença de granulomas não caseosos num único órgão, como a pele, não estabelece diagnóstico de sarcoidose e não é específica, uma vez que estes também podem existir noutras condições. A reação inflamatória que dá origem aos granulomas reflete-se no LBA. Uma linfocitose é menos específica enquanto que um aumento da razão CD4/CD8 está mais associada à sarcoidose. A acumulação de linfócitos leva à formação de estruturas discretas compostas por um centro de células epitelióides, rodeadas por macrófagos alveolares ativados e linfócitos Th. Há libertação de várias citocinas (IL-1, IL-2, IL-18) e TNF- α . Este infiltrado de

células CD4⁺ ativadas e necessárias para o desenvolvimento do granuloma engloba os dois tipos funcionais Th₁ e Th₂ que regulam a RI no pulmão localizando-se, também, noutros órgãos afetados e que exprimem HL-DR, entre outros marcadores de ativação. Os macrófagos alveolares também se encontram ativados devido ao INF- γ secretado pelos linfócitos Th₁. Esta citocina é fundamental na sarcoidose e também noutras doenças granulomatosas (4,60,61).

II.4.2. Pneumonite por hipersensibilidade ou alveolite alérgica extrínseca

Também conhecida como alveolite alérgica extrínseca (AAE), o termo PH designa um grupo de doenças resultantes da inalação repetida e da sensibilização a um grande número de partículas orgânicas. Tal como a sarcoidose, é uma doença granulomatosa mas de etiologia conhecida, com envolvimento exclusivamente pulmonar e que resulta de uma RI à inalação de agentes orgânicos ou químicos de baixo peso molecular (62). A importância desta doença reside no facto de, uma vez identificado e afastado o agente causador, poder estabilizar-se ou reverter totalmente.

A lista de agentes que podem causar PH é extensa. Uma história que sugira uma relação temporal entre os sintomas e certas atividades profissionais ou passatempos é o melhor indício para o diagnóstico. A inalação dos alergénios pode provocar dois tipos de sintomatologia (5):

- Sintomas resultantes da exposição aguda ao Ag. Após a inalação, ocorre uma resposta de hipersensibilidade do Tipo III. Os imunocomplexos gerados no local de entrada do alergénio no pulmão ativam o complemento e estabelece-se a inflamação. Os indivíduos acometidos apresentam dispneia, febre e tosse entre 4-8 horas após exposição ao Ag, com resolução nas 12 a 24 horas seguintes.
- Sintomas resultantes de FP crónica. A exposição repetida ao Ag resulta numa reação de hipersensibilidade do tipo IV, mediada por células, com pequenos granulomas visíveis histologicamente. Isto provoca uma fibrose intersticial e uma manifestação insidiosa de tosse e dispneia resultando, eventualmente, em pulmão em “favo de mel” em aproximadamente 5% dos casos.

O RX, nas formas agudas de PH pode ser normal mas, tipicamente, mostra regiões micronodulares disseminadas ou de predomínio basal e infiltrados, difusos também podem estar presentes. Nas formas crónicas, infiltrados reticulares disseminados afetam ambos os pulmões.

Nessa fase, a TCAR costuma mostrar áreas de densidades lineares e faveolamento, simulando a FP. O diagnóstico de PH, é, geralmente confirmado por biópsia cirúrgica. Histologicamente, os achados são os de uma bronquiolite celular associada a um infiltrado intersticial mononuclear e a alguns granulomas. O tratamento da PH baseia-se, principalmente, na detecção e afastamento do Ag causador do processo, o que nem sempre é facilmente atingido (5).

Nestas doenças, a característica principal do LBA é a marcada linfocitose (com frequência superior ao 60%) com diminuição do quociente CD4/CD8. Esta costuma associar-se um aumento de mastócitos e até 2% de plasmócitos. No entanto, esta fórmula celular varia segundo o tempo decorrido entre a exposição ao Ag e a realização do LBA. Nas 24 h seguintes à exposição encontra-se uma neutrofilia, que desaparece rapidamente em poucos dias. Posteriormente, a partir do primeiro mês a percentagem de mastócitos diminui progressivamente e o quociente CD4/CD8 tende a normalizar (19).

No diagnóstico diferencial entre a sarcoidose e a PH considera-se, frequentemente, útil o estudo imunológico do LBA, sobretudo a relação CD4/CD8, já que na primeira entidade há um predomínio de células T CD4+ e na segunda um predomínio de CD8+. Na PH existem alguns casos reportados, embora menos, em que esta relação se encontra normal ou aumentada, ao contrário do esperado e, por vezes com valores tão elevados como na sarcoidose (62).

Por outro lado, deve ter-se em conta que sujeitos assintomáticos e expostos a Ag (por exemplo tratadores de pombos, agricultores) podem apresentar linfocitose com aumento da razão CD4/CD8 (19).

II.4.3. Pneumonias eosinofílicas

Os infiltrados eosinofílicos do pulmão podem ser encontrados numa grande variedade de distúrbios como a asma eosinofílica, a PE aguda ou crónica e a aspergilose broncopulmonar alérgica ou vasculite de Churg e Strauss. Apesar da etiologia ser, geralmente, desconhecida suspeita-se de hipersensibilidade, devido à ocorrência de síndromes semelhantes introduzidos por agentes conhecidos. Os pacientes afetados com PI, em geral, apresentam eosinofilia superior a 10% no sangue periférico. Alguns, apresentam infiltrados pulmonares eosinofílicos sem eosinofilia periférica. Muitas PE estão associados a asma, sendo a presença desta útil para o diagnóstico diferencial. A asma, em geral, precede o início da aspergilose broncopulmonar

alérgica e da granulomatose alérgica de Churg e Strauss, estando frequentemente associada à PE crónica ou PE crónica de Carrington (46,63).

Na PE crónica de Carrington as manifestações mais comuns consistem em tosse, febre (até 40°C), dispneia, perda de peso, mal-estar e sudorese noturna. A eosinofilia no sangue periférico é encontrada em 85% dos pacientes durante o curso desta doença embora também possa estar ausente, na apresentação inicial, num terço dos pacientes. As alterações observadas no RX são variáveis. Observou-se um grupo clássico e quase patognomónico de dados em cerca de 25% dos casos: infiltrados alveolares periféricos não-segmentares, que desaparecem 2 a 4 dias após o tratamento com corticosteróides e resulta, quase sempre, na rápida melhoria da PE crónica. A ausência de melhoras com o uso de corticosteróides deve levantar dúvidas quanto à exatidão do diagnóstico. Com frequência ocorre melhoria dentro de poucas horas e o RX normaliza em 2 a 4 dias (63).

Segundo a Sociedade Europeia de Pneumologia, as doenças eosinofílicas do pulmão são um grupo de patologias em que o LBA pode fornecer pistas suficientes para o seu diagnóstico, sendo de grande utilidade na ausência de eosinofilia no sangue periférico e quando as alterações do raio-X são atípicas (9). Neste tipo de distúrbios, como os eosinófilos estão amplamente concentrados nos espaços alveolares, o valor diagnóstico do LBA é muito elevado, tornando técnicas invasivas como a BP a céu aberto ou BT desnecessárias (46).

Os valores mais elevados de eosinófilos são encontrados nas PE agudas ou crónicas, podendo atingir os 90% (19,26). Nesses casos, também poderá aumentar o número total e a percentagem de linfócitos ou de polimorfonucleares, mas sempre em menor percentagem que a dos eosinófilos. Em conjunto com a clínica e dados radiológicos compatíveis, esta eosinofilia presente no LBA é suficiente para o diagnóstico de PE (19,64,65).

II.4.4. Histiocitose X ou granulomatose pulmonar de células de Langerhans

Existem 3 doenças sistémicas (Letterer-Siwe, Hand-Schüller-Christian e granuloma eosinofílico do pulmão ou histiocitose pulmonar) que têm em comum uma proliferação anormal de células de Langerhans (Fig. 9). A histiocitose pulmonar é a forma de histiocitose X do adulto e envolve primariamente o pulmão. Segundo Basset, os termos histiocitose e granuloma eosinofílico não estão corretos, pois não são os histiócitos as células primariamente envolvidas, nem se trata de uma massa granulomatosa única, mas sim de uma doença disseminada (66).

Na realidade, o que é característico é a presença de um grande número de células de Langerhans, daí que a designação mais correta seja granulomatose pulmonar de células de Langerhans (67).

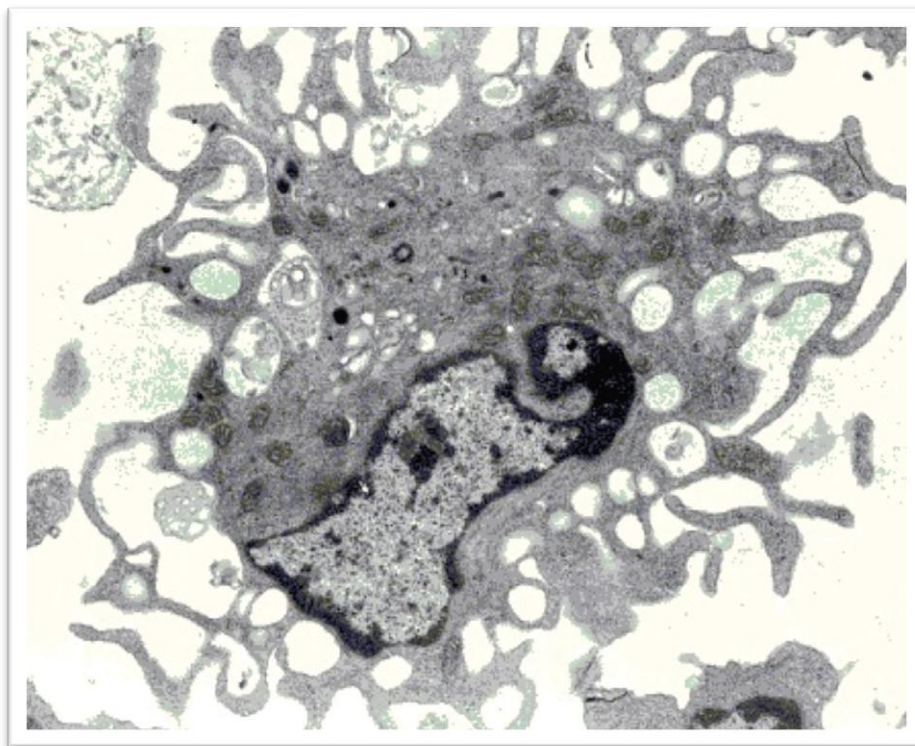


Figura 9 - Ultraestrutural da célula de Langerhans (Retirado de <http://www.nature.com>, 2013).

Nesta, a análise ultraestrutural das células de Langerhans demonstra que estas são idênticas às células da pele. O que as distingue é a presença intracitoplasmática de grânulos de Bierbek ou corpos X que são inclusões pentalaminares visíveis em microscopia eletrônica. Estas inclusões (grânulos de Bierbek) são formadas por um conjunto de moléculas de adesão diferentes das normais, que poderá contribuir para a migração anormal destas células para os tecidos. Alguns estudos mostraram que as células de Langerhans estão presentes no trato respiratório inferior e no parênquima pulmonar de indivíduos normais. Alterações neste epitélio parecem ser um importante estímulo para atrair essas células para o pulmão, local onde o fumo do tabaco tem um papel ativo no aparecimento de alterações do epitélio do trato respiratório inferior.

A lesão epitelial pode atrair mais células dendríticas e, eventualmente, provocar a sua evolução para células de Langerhans. Estas, e as dendríticas, tem uma grande capacidade de

apresentação de Ags e podem, como células acessórias, iniciar respostas a Ag endógenos. A doença parece resultar duma RI descontrolada a um Ag desconhecido, iniciada pelas células de Langerhans (67,68).

Nas situações anteriormente descritas os pacientes apresentam tosse improdutiva, dor pleural, devida a pneumotórax espontâneo, e dispneia de esforço. Também podem ocorrer hemoptises, febre, perda de peso e sibilos. Histologicamente encontra-se alveolite, granulomas e lesões resultantes da fibrose. A TCAR revela múltiplos quistos de paredes finas e nódulos, distribuídos por ambos os pulmões que podem atingir os 10 mm de diâmetro, e que predominam nas zonas subpleurais. A fibrose é muito variável e relaciona-se com a extensão das lesões granulomatosas e da alveolite (5).

As grandes massas de granulomas cavitados, com grande destruição tecidular levam ao aparecimento de pulmão “em favo” e de grandes bolhas, cuja extensão nem sempre é apreciável pelo RX do tórax ou pela BP. O diagnóstico definitivo exige uma BP por toracoscopia ou a céu aberto (quando um LBA localizado possa falhar o diagnóstico) bem como uma BT. Do ponto de vista morfológico, ocorre o desenvolvimento de uma reação granulomatosa de distribuição broncocêntrica, mas que também afeta as paredes dos vasos sanguíneos e o interstício. Nessas lesões, são encontradas células de Langerhans, monócitos, eosinófilos e linfócitos. Para além disso, pode observar-se uma vasculite granulomatosa. A evolução clínica da histiocitose X é variável, podendo ocorrer remissão espontânea, estabilização ou progressão da doença (5).

As células de Langerhans podem ser detetadas pelos seus grânulos de Birbeck característicos e/ou por imunofluorescência com Acs monoclonais anti-CD1a e, de uma forma mais específica, com Ac anti-langerina. Podem, também, ser identificadas pela proteína intracelular S-100 sendo, a sua eficácia diagnóstica inferior uma vez que esta também pode ser observada noutros tipos celulares, tais como células neuroendócrinas e alguns macrófagos (19,53).

Hance e colaboradores (1986) reportaram que 90% dos indivíduos com histiocitose X eram fumadores e que os não-fumadores, com histiocitose X, apresentavam um LBA com contagens normais (69). A presença de células de Langerhans no LBA não faz diagnóstico de histiocitose X, especialmente em doentes fumadores, sendo, para isso, necessário haver mais de 5% de células CD1+, para confirmar o diagnóstico. No entanto, a ausência de células CD1+ não descarta o diagnóstico, pois estas só estão presentes em 50-70% dos casos. Em fumadores com outras patologias intersticiais, também se podem encontrar células CD1+, mas em percentagens

inferiores, que não costumam ultrapassar os 3% (19,46,53). Todavia, resultados falsos negativos podem surgir devido à desigual distribuição e resultados falsos positivos podem ser encontrados em fumadores compulsivos ou em carcinoma broncoalveolar.

Os resultados do LBA devem ser interpretados de uma forma cuidadosa no contexto radiológico e clínico. Os falsos negativos requerem pelo menos 5% de células de Langerhans no LBA para confirmação de diagnóstico, sendo a especificidade do teste boa, mas a sensibilidade parece ser bastante baixa. Os falsos positivos dão pistas para o diagnóstico, ou indiciam a necessidade de BP a céu aberto (19,53).

Takizawa e colaboradores (2009) confirmaram, posteriormente, a importância do LBA no diagnóstico complementar da Histiocitose X e compararam os citoesfregaços das células marcadas positivamente para CD1 e S-100, com outros corados com giemsa para posterior contagem de células de Langerhans. Concluíram que as células marcadas positivamente para CD1 e S-100 eram comparáveis com as células coradas com giemsa, comprovando que o estudo das células de langerhans no LBA em conjunto com uma avaliação imuno-histoquímica, e outros dados clínicos constituía um elemento importante e menos agressiva do que a BP no estabelecimento do diagnóstico de histiocitose X (69).

Na prática, o LBA não estabelece um diagnóstico definitivo de histiocitose de células de Langerhans em adultos, mas fornece orientação adicional, mostrando uma elevada contagem de macrófagos alveolares e é da maior utilidade no diagnóstico diferencial, em pacientes sem achados radiológicos típicos. O LBA pode ser utilizado para descartar certas infecções pulmonares tais como formas de *P.jiroveci*, que podem causar confusão, em certos casos (26).

II.4.5. Proteínose alveolar pulmonar

A PA é uma doença rara caracterizada pela acumulação nos espaços alveolares, de surfactante, um fluido proteico rico em lípidos. Deve-se a anomalias na *clearance* do surfactante, realizada pelos macrófagos alveolares. A sua etiopatogenia pode estar relacionada com mutações, tais como a deficiência de proteína B do surfactante (SP-B), que pode ser secundária a inalação tóxica ou processo auto-imune, com presença de Acs anti-GM-CSF, que bloqueiam a ativação dos macrófagos alveolares. Também pode estar associada a alterações hematológicas (em cerca de 10% dos casos) que incluem leucemia mieloblástica, leucemia mielóide crônica, paraproteinemia e anemia de Fanconi. A PA autoimune é a mais comum e representa 90% dos casos (70,71).

A PA caracteriza-se por: (1) RX anormal em pacientes assintomáticos; (2) início abrupto de tosse, febre e desconforto torácico, devido a alguma infecção sobreposta, ou (3) início insidioso de tosse e dispneias relacionadas com a acumulação de grandes quantidades de material lipoproteico intra-alveolar.

A evolução clínica da PA é altamente variável e pode incluir: (1) uma doença progressiva com infecção pulmonar sobreposta apesar dos lavados frequentes e repetidos; (2) doença estável e recorrente, exigindo lavados repetidos (a cada 6 a 24 meses); (3) melhoria sem recidiva ou (4) desenvolvimento de DIP grave. A sua apresentação clínica e radiológica não é específica. O seu diagnóstico pode ser feito com base na TCAR, em conjunto com os achados do LBA se estas metodologias não forem conclusivas, procede-se à análise de tecido pulmonar obtido por BT ou vídeo-assistida (4).

A realização do LBA é necessária para o diagnóstico da PA e pode evitar a BT sendo considerada diagnóstica quando se cumprem os seguinte critérios: - O LBA apresenta aspeto macroscópico opaco e leitoso; escassez de macrófagos alveolares de aspeto espumoso, com citoplasma vacuolizado e contendo pequenos grânulos eosinofílicos, com material hialino extracelular, e exame citológico do material fosfolipoproteico homogeneamente positivo quando corado com ácido periódico de *Shiff* (devido ao aumento de lipoproteínas e da apoproteína A do surfactante) e negativo para a coloração com azul de Alcian (26) (Fig.10).

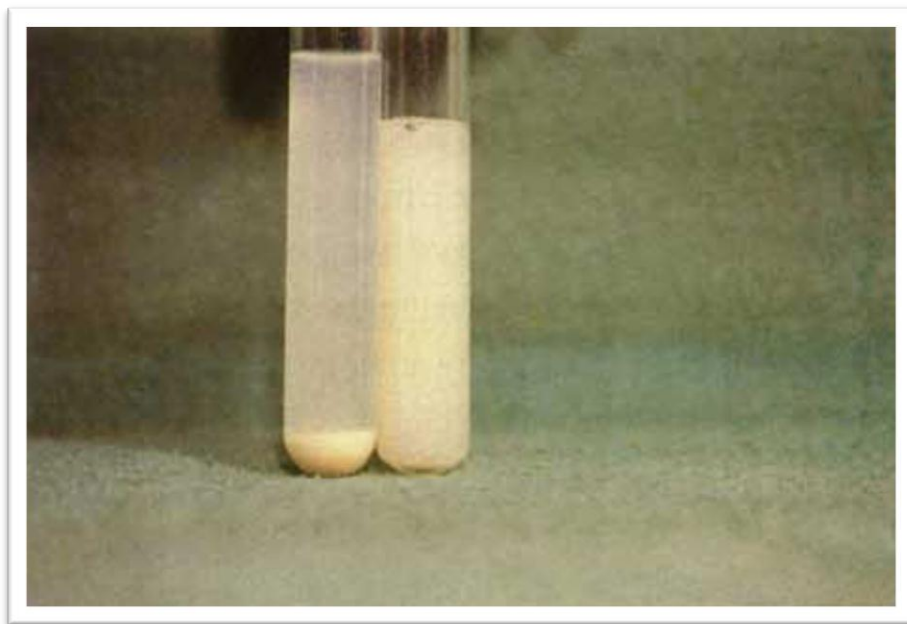


Figura 10 - Proteinose alveolar: LBA com aspeto opalescente (*Retirado de Silveira , 1997*).

II.4.6. Fibrose pulmonar idiopática (alveolite fibrosante criptogénica)

A FP é o estadio terminal e irreversível das DIP. É uma doença crónica progressiva que se inicia como uma alveolite e progride até à fibrose dos pulmões. É a forma mais comum de PII e apresenta características clínicas, radiológicas, funcionais e histopatológicas próprias. Na sua génese estão considerados fatores genéticos, infeções virais e processos inflamatórios de natureza autoimune. A teoria mais aceite para o desenvolvimento da FP admite a influência de fatores ambientais tais como infeções virais, que se comportam como agentes desencadeantes de uma cascata inflamatória ao nível pulmonar. Os agentes agressores, ao lesarem tecidos e células pulmonares, desencadeiam uma resposta inflamatória aguda, que caracteriza a fase inicial da doença. Essa resposta, em condições fisiológicas, seria autolimitada mas, nos casos de FP idiopática torna-se crónica, devido a razões desconhecidas que promovem alterações dos mecanismos de reparação pulmonar (5).

A FP tem início insidioso e o principal sintoma é, geralmente, dispneia não sibilante e despertada pelo exercício, à medida que a doença evolui, e tosse seca. A fibrose da parede alveolar reduz a rede capilar pulmonar, produzindo hipertrofia ventricular direita e hipertensão pulmonar, com eventual insuficiência cardíaca direita “cor pulmonale”. O RX costuma mostrar um volume pulmonar reduzido, com um infiltrado bilateral reticular ou reticulonodular e opacidades em favo de mel. Há distorção arquitetural com bronquiectasias e bronchiolectasias de tração. Tal infiltrado é normalmente difuso, com predomínio nas bases pulmonares e traduzindo-se por um aspeto de doença não uniforme, com áreas de pulmão normal e de inflamação. Este padrão, anatomopatológico corresponde ao da chamada PIU, caracterizada pela presença de fibrose intersticial não uniforme e por áreas de parênquima normal, com inflamação intersticial com fibrose ligeira e com parênquima destruído. Este padrão histológico, frequentemente associado à FPI, também pode ser encontrado em outras doenças como a artrite reumatoide ou a esclerose sistémica. Um padrão histológico, que também pode estar presente na FPI, é a PID (6,42).

Para a confirmação da presença de FP não existe nenhum teste definitivo ou específico. Geralmente efetua-se uma BP ou a céu aberto, para excluir outras alterações tais como infeções granulomatosas, sarcoidose ou bronquiolite com pneumonia obstrutiva e para selecionar os pacientes que tem mais probabilidade de responder ao tratamento. As alterações patológicas revelam uma grande variabilidade entre pacientes e entre diferentes amostras de biópsias, sugerindo a ocorrência de lesões pulmonares a diferentes velocidades (63).

Embora a evolução clínica dos doentes com FPI possa ser variada, o prognóstico em geral é desfavorável. A mortalidade, quatro anos após o diagnóstico, é de cerca de 50%. Recentemente, o prognóstico dos transplantados por FPI tem sido encorajador pelo que a proposta destes pacientes para transplante pulmonar deverá ser equacionada e ponderada (5,6).

Os macrófagos alveolares e intersticiais desempenham um papel importante na patogenia da FP, através da libertação de substâncias oxidantes que lesam o epitélio pulmonar e de fatores quimiotáticos que atraem os neutrófilos e os eosinófilos. Estas células, podem determinar as características patológicas da FP. O aumento do número de leucócitos polimorfonucleares e a fibrose generalizada no parênquima pulmonar também são dados relevantes (63, 72).

II.4.7. Colagenoses

As doenças do colagénio representam um grupo heterogéneo de síndromes em que ocorre uma reação inflamatória e uma grande variedade de órgãos pode ser afetada. Os processos inflamatórios, que se desenvolvem no pulmão, em muitas doenças do colagénio, normalmente resultam em DIP. As vias aéreas, os alvéolos, o sistema vascular e a pleura são afetados em graus variáveis. A TAC ajuda a caracterizar e a determinar a extensão da DIP nas doenças do colagénio (73).

Mais de 25% dos pacientes com doença autoimune sistémica não satisfazem os critérios de diagnóstico de colagenose e são classificados como tendo uma colagenose difusa ou indiferenciada. Na BP estes pacientes evidenciam um padrão de PII.

Uma vez que a inflamação alveolar é uma característica de pacientes com doenças do colagénio, com ou sem DIP associada, a citologia do LBA não é considerada válida para o diagnóstico das DIP, neste contexto. O tipo de alveolite varia segundo a doença do colagénio implícita. No grupo de patologias estudado pode encontrar-se uma alveolite linfocítica ou neutrofílica (alveolite subclínica) na presença, ou ausência, de patologia pulmonar manifesta. O aumento de neutrófilos ou eosinófilos associa-se a uma maior afetação pulmonar e a tendência para fibrose, estando a linfocitose associada a um bom prognóstico (19,46,74,75).

Na esclerodermia, dermatomiosite e doença mista do tecido conjuntivo encontra-se uma neutrofília, tanto na alveolite latente como clínica. Pelo contrário, na artrite reumatoide, LES e síndrome de Sjögren primário pode haver uma alveolite latente e linfocítica T, com predomínio de linfócitos CD4+, que se converte em neutrofília quando há doença pulmonar clinicamente

evidente (55,73). Nestes pacientes, o LBA pode ser útil para o estudo da toxicidade por fármacos ou no diagnóstico de complicações infecciosas. A síndrome de Sjögren pode associar-se a transtornos linfoproliferativos diagnosticáveis no LBA (19,46).

II.4.7.1. Artrite reumatoide

Apesar da artrite reumatóide ser mais comum em mulheres, quando associada à DIP é mais comum nos homens e ocorre em pacientes com início tardio. Os sinais clínicos assemelham-se aos observados na FP. Frequentemente, os sintomas pulmonares surgem após o início da artrite. No entanto, pode ocorrer instalação simultânea de DIP e da artrite e, em 20% dos casos, a DIP precede as manifestações articulares (73).

As alterações fisiológicas das DIP reumatóides são idênticas às de outras doenças pulmonares fibrosantes. A BP, realizada na fase inicial da doença revela pneumonite intersticial com infiltração perivascular, peribronquiolar e intersticial por linfócitos, plasmócitos e macrófagos. Este infiltrado linfocítico proeminente é útil para diferenciar a DIP reumatóide da FPI. A DIP reumatóide parece ser mais indolente e menos grave do que a FPI, podendo ocorrer períodos prolongados de estabilidade sintomática e clínica. Os sais de ouro e o metotrexato, que constituem terapias comuns para a artrite reumatóide, também podem induzir DIP. É difícil diferenciar a DIP fármaco-induzida da causada pela artrite reumatóide, mas a resultante da terapêutica pode ser revertida pela interrupção da administração do fármaco (5).

II.4.7.2. Lupus eritematoso sistémico

Embora o LES geralmente envolva o pulmão, a evolução para FP crónica é rara. Frequentemente, a lesão aguda na unidade alvéolo-capilar dá origem à pneumonite lúpica aguda e / ou hemorragia alveolar. A pneumonite lúpica aguda caracteriza-se pelo início agudo ou subagudo com taquipneia, taquicardia, dispneia, tosse e cianose. Em 50% dos pacientes com pneumonite lúpica aguda e estas manifestações constituem a manifestação inicial do LES (5).

Em alguns indivíduos ocorre, provavelmente, a evolução da DIP aguda para a forma crónica, visto que se pode verificar o desenvolvimento de doença persistente após uma instalação aguda. O impacto global da DIP sobre a taxa de mortalidade no LES parece ser pequeno. As DIP causam morte em cerca de 2,5% dos casos de LES (5).

II.4.7.3. Esclerodermia

A esclerodermia ou esclerose sistémica é uma colagenose autoimune que atinge a pele e vários órgãos viscerais. Cerca de 90% dos pacientes desenvolvem FP. A DIP constitui a manifestação pulmonar mais comum da esclerodermia, e existe uma associação significativa entre o desenvolvimento de carcinoma brônquico e FP crónica.

A alveolite que caracteriza as colagenoses é semelhante à da FP mas, nestas doenças, a presença de uma alveolite não implica a existência de FP (5,7, 76).

Pacientes com esclerodermia e DIP associada têm uma maior proporção de neutrófilos e eosinófilos. A linfocitose surge com mais frequência antes ou logo após o aparecimento dos sintomas pulmonares. Para além disso, as anomalias encontradas no LBA foram também observadas no trato respiratório inferior mas sem envolvimento pulmonar óbvio (alveolite subclínica) sugerindo que as alterações inflamatórias poderiam constituir o primeiro passo conducente a FP em vez de serem um processo secundário (77).

II.4.8. Doença pulmonar intersticial induzida por fármacos

As doenças pulmonares induzidas por fármacos podem afetar as vias aéreas, o parênquima pulmonar, a circulação pulmonar, a pleura, os gânglios linfáticos torácicos e o sistema neuromuscular. Há, presentemente, mais de 100 fármacos que alteram a estrutura e função das vias respiratórias inferiores. O sintoma mais comum é a tosse discreta. A febre e a eosinofilia também podem ocorrer mas são menos frequentes (5,78).

As DIP induzidas por fármacos são, na sua maioria, reversíveis se identificadas precocemente e quando se interrompe a administração do agente causal. Podem ser agudas, subagudas ou crónicas. As formas aguda e subaguda, em geral, apresentam febre e tosse, podendo ser confundidas com pneumonia bacteriana. A forma crónica tem natureza insidiosa.

O diagnóstico da DIP induzida por fármacos pode ser dificultado pela falta de especificidade dos aspetos clínicos, imagiológicos e patológicos, muitas vezes o quadro clínico é semelhante ao das DIP de causa idiopática. Uma droga pode causar várias manifestações clínicas. No entanto, algumas apresentações típicas podem sugerir a procura do fármaco causador. Alguns doentes crónicos que tomam medicação durante meses ou anos, desenvolvem dispneia progressiva com febre e tosse leve. Em doentes assintomáticos as DIP podem ser

descobertas no Raio-X do tórax. Alguns pacientes com DIP aguda, podem necessitar de ventilação mecânica. É importante ter critérios confiáveis e sistemáticos de reconhecimento e diagnóstico de DIP induzidas por fármacos, de forma a prevenir alterações irreversíveis (46,78).

O LBA pode fornecer importantes informações para fazer a distinção de causas iatrogénicas de etiologias malignas ou infecciosas, devendo estas ser interpretadas à luz de outros dados (história clínica, exames radiológicos, etc.). O LBA pode como nas doenças do colagénio, eliminar possíveis diagnósticos (infecções, hemorragias pulmonares e neoplasias) e analisar a patogenia da doença (19,26,49).

Nas DIP induzidas por fármacos de um modo geral, o LBA mostra um aumento do nº total de células, com predomínio da alveolite linfocítica (> 60% dos casos) que é acompanhada por um aumento das células CD8+, com a consequente diminuição da razão CD4/CD8. A remoção do fármaco causal é acompanhada por uma normalização da linfocitose e pode ter valor diagnóstico. Uma hemorragia alveolar, detetável pelo LBA, pode observar-se nas pneumonites induzidas por D-penicilamina e anfotericina B (79,80).

A amiodarona é uma das causas mais conhecidas de infiltrados pulmonares. A maior parte desses casos cursam com alveolites linfocíticas com predomínio de células CD8+, às quais se associa uma diminuição do número total de macrófagos, podendo também haver neutrofilia e eosinofilia associadas. A amiodarona origina a acumulação de inclusões lamelares de natureza fosfolipídica no citoplasma de macrófagos (que surgem com aspeto vacuolizado), observáveis por histoquímica (Fig. 10). A linfocitose é comum à maior parte das pneumonites causadas por fármacos e sugere um mecanismo imunopatogénico semelhante ao das alveolites alérgicas extrínsecas. Há necessidade de excluir causas ambientais, através de uma história clínica exaustiva, quando se faz o diagnóstico de pneumonite iatrogénica (79-81).

Na fase inicial da hipersensibilidade da DIP induzida por fármacos (< 48h) é encontrada uma alta % de neutrófilos, especialmente quando há hemorragia alveolar associada. Noutras situações, a % de neutrófilos sugere o desenvolvimento de uma FP, que pode ser devida a uma toxicidade direta provocada por fármacos, como a bleomicina. É útil descartar uma infeção, em pacientes que tomem medicação imunossupressora ou estejam a fazer quimioterapia (79,81,82).

O metotrexato é utilizado por doentes com artrite reumatóide. O LBA apresenta uma linfocitose, inicialmente com predomínio de linfócitos CD4+ e, posteriormente, a presença também de células CD8+. Em alguns casos, pode haver um início com predomínio de neutrófilos. Alguns fármacos, como a nitrofurantoína e os citostáticos, podem causar formas secundárias de PA e outros podem estar associados com alveolites não linfocíticas, por exemplo as tetraciclina, a sulfassalazina e a bleomicina que cursam com alveolites eosinofílicas (79,83).

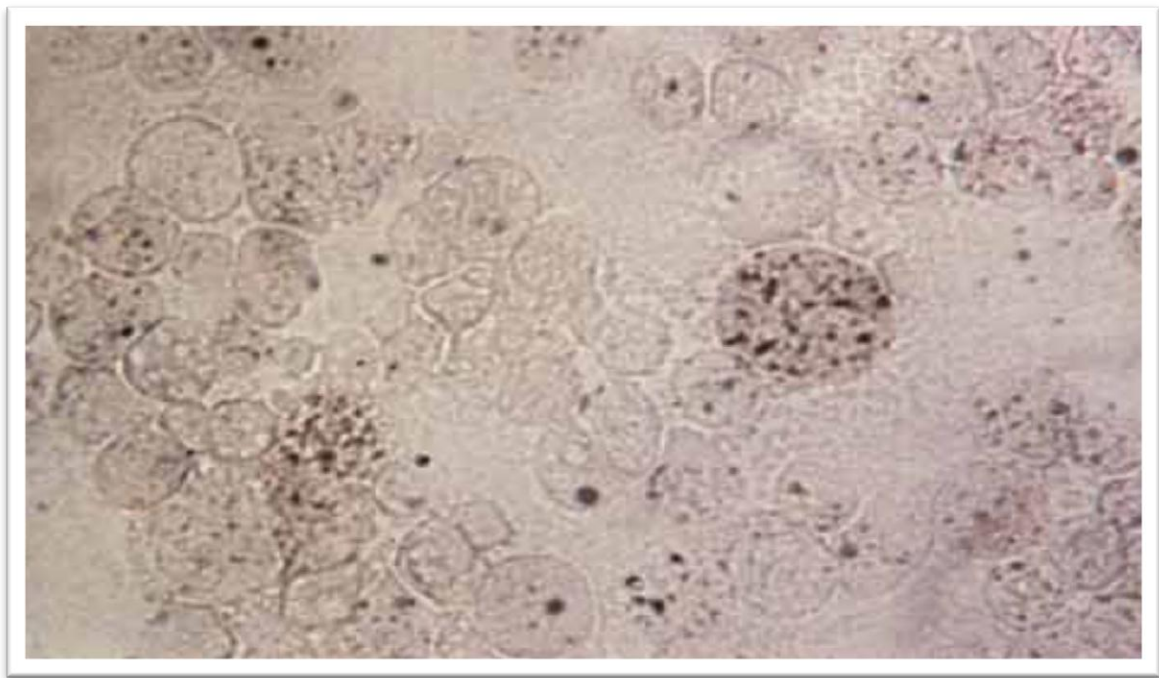


Figura 11 - Pneumonite por amíadrona. Presença de macrófagos vacuolizados (*Retirado de Silveira P, 1997*).

II.4.9. Doenças pulmonares ocupacionais

As DIP ocupacionais provocam lesão no interstício, na sequência da rutura das estruturas alveolares e das pequenas vias aéreas. As principais são as pneumoconioses (provocadas por partículas inorgânicas) e a PH. As DIP ocupacionais resultam da inalação e retenção de poeiras que provocam a inflamação. Esta, juntamente com a FP constituem a componente central na patogenia destas doenças (6).

Os mecanismos das pneumoconioses enfatizam o papel dos macrófagos alveolares na resposta inicial à inalação de poeira, na libertação de citocinas e nas interações entre

macrófagos. A exposição, o RX, as provas de função pulmonar e a TCAR constituem os componentes fundamentais na avaliação diagnóstica (5,6).

A história clínica das DIP ocupacionais deve incluir os sinais e sintomas respiratórios principais (tosse, dispneia e sibilos) devendo salientar-se a quantificação do grau de dispneia. O RX ajuda a detetar e a monitorizar a resposta pulmonar aos pós minerais, a alguns metais e a poeiras orgânicas capazes de causar PH (6).

A classificação internacional de radiografias das pneumoconioses da organização internacional do trabalho (OIT) classifica o RX de acordo com o tipo e dimensão das opacificações detetadas e a extensão do atingimento do parênquima pulmonar. Em alguns casos pode realizar-se o LBA e a BT do parênquima pulmonar, para se esclarecer o diagnóstico histológico (5).

As pneumoconioses são DIP ocupacionais por acumulação de partículas inorgânicas às quais se associa a uma resposta inflamatória e, por vezes uma fibrose. A alteração pulmonar ocorre quando a poeira interage com os mecanismos de defesa do pulmão. O destino normal da poeira inalada seria a eliminação através da tosse ou a ingestão pelos macrófagos. Quando a poeira é tóxica para os macrófagos, existe inflamação local, liberação de citocinas e estímulo à formação de fibrose. Existem diferentes tipos de pneumoconioses, embora os mais frequentes sejam a asbestose, a silicose e a berliose (5).

A asbestose contempla fibrose do parênquima pulmonar e placas, que são frequentemente observadas em trabalhadores expostos ao asbesto. Entre as exposições profissionais a asbestos, referem-se a da construção naval (isolamento de tubagens) e a civil (isolamentos térmicos e sonoros, tetos de fibrocimentos, etc.). A exposição ao asbesto também está associada ao aparecimento de mesotelioma da pleura e do peritoneu, cancro do pulmão, cancro da laringe e, possivelmente, cancros gastrointestinais (6).

Os asbestos são silicatos hidratados fibrosos, classificáveis em seis tipos consoante as suas características físico-químicas. A dose cumulativa de fibras inaladas e o tipo de fibra, com características físico-químicas e dimensões próprias, são condicionantes do efeito carcinogénico e do seu potencial fibrogénico. Fibras de maior dimensão são apenas parcialmente fagocitadas, e deste modo, estimulam de forma persistente os fagócitos, levando-os a libertar citocinas, fatores de crescimento e radicais livres. O quadro clínico-funcional é semelhante ao de FP, mas com dispneia de esforço progressiva, crepitações basais, síndrome restritiva, compromisso da difusão alvéolo-capilar e aumento do gradiente alvéolo-arterial de O₂ (84).

Na silicose verifica-se que, apesar da adequação técnica dos equipamentos de proteção existentes, a sílica livre (SiO_2) ou quartzo cristalino, ainda é um risco ocupacional importante. Entre as múltiplas atividades profissionais com exposição à SiO_2 aponta –se as de indústria extrativa (minas, pedreiras, e abertura de túneis), de cerâmica, e do vidro, a utilização de areias com fim abrasivo, o trabalho com granitos, etc. Na maioria dos casos, a FP causada por exposição à sílica segue um padrão de dose-resposta, depois de muitos anos de exposição.

No caso do SiO_2 (quartzo, cristobalite e tridimite) que está na origem da silicose, desenvolvem-se lesões micronodulares e nodulares que, confluindo, poderão gerar massas fibróticas. Uma fração das partículas de sílica inaladas é eliminada pela tosse e pelo tapete mucociliar mas, a fração com dimensão inferior a $5\mu\text{m}$ atinge o pulmão profundo, sendo fagocitada pelos macrófagos alveolares. Muitas partículas serão eliminadas pelas vias aéreas mas outras atingem o interstício, as vias linfáticas e os gânglios regionais. A interação das partículas com os macrófagos, induz a ativação macrofágica, conducente à libertação de quimiocinas, citocinas, fatores de crescimento e fibrogénicos, radicais oxidativos e proteases, que estão na origem de um processo imuno-inflamatório crónico e lentamente evolutivo (5,6).

Como a sílica é citotóxica para os macrófagos alveolares, os pacientes com silicose correm um risco mais alto de adquirir infeções pulmonares (*Mycobacterium tuberculosis*, micobactérias atípicas e fungos).

Outras complicações clínicas potenciais da silicose são os distúrbios autoimunes do tecido conjuntivo, incluindo a artrite reumatóide e a esclerodermia. O nódulo silicótico é uma lesão histopatológica elementar, formada por um núcleo de colagenização, em faixas concêntricas e acelular, no seio do qual são identificáveis partículas de sílica, por birrefringência. A silicose designada *simples* vai evoluindo de forma assintomática e “surge” após um período de latência de 20 ou mais anos e, na sua forma *acelerada*, surge com uma área lesional mais extensa no parênquima e com clara progressão da limitação funcional, evoluindo num período inferior a 10 anos (5).

As formas *agudas* de silicose resultam de condições de exposição intensa, em indivíduos particularmente suscetíveis, traduzindo-se por imagens acinares confluentes que comprometem as bases pulmonares e conduzem, num curto espaço de tempo (<3 anos), a insuficiência respiratória (5,6).

A silicose *complicada* corresponde aos casos com evolução fibrótica maciça e progressiva, com manifestações clínicas de tosse mais ou menos produtiva, dispneia,

insuficiência respiratória e “*cor pulmonale*” e ocorrência de hemoptises e pneumotórax secundário. As associações de silicose a tuberculose e a conectivopatias, caso da artrite reumatóide e da esclerose sistêmica apresentam quadros clínicos mais complexos.

Na silicose há um aumento do número total de células, predominantemente neutrófilos, e a diminuição do quociente CD4/CD8. Estudou-se a ação dos macrófagos na libertação de fatores quimiotáticos por neutrófilos, na libertação de radicais livres e enzimas e na secreção de fatores de crescimento estimulantes da fibrose, tais como a fibronectina, entre outros.

A berlíose é uma DIP granulomatosa que resulta da inalação de poeiras e fumos de berílio, um metal raro que hoje em dia é amplamente utilizado em alta tecnologia.

Os casos típicos de berlíose, atualmente observados, caracterizam-se pela sua inalação gradual e são crônicos. Os progressos na compreensão da patogenia da doença levaram ao desenvolvimento de uma prova de triagem e marcador de susceptibilidade individual ao metal. Também já foi identificado um marcador genético. A berlíose crônica é um dos exemplos mais bem estudados da interação entre gene e ambiente. Relatou-se uma forte associação entre a susceptibilidade à berlíose e um fenótipo específico associado ao complexo MHC HLA-DP β 1 e a berlíose. Além disso, também há evidências de que um polimorfismo, na posição 308 da região promotora do TNF- α , esteja envolvida na determinação da gravidade da resposta inflamatória dos pacientes com berlíose crônica (5).

Os pacientes com berlíose podem apresentar sintomas respiratórios e sistêmicos e a expressão clínica é muito próxima da que se observa na sarcoidose, incluindo a formação de granulomas epitelióides e o predomínio de linfócitos CD4+. Geralmente é necessário realizar broncofibroscopia com BT para se estabelecer o diagnóstico. Nos indivíduos com sensibilidade ao berílio, a presença de granulomas não caseosos ou de infiltrados monocíticos, no tecido pulmonar, confirma o diagnóstico, observando-se acumulação de linfócitos T CD4+ específicos para o berílio, na inflamação granulomatosa (38).

Nas doenças por inalação de poeiras inorgânicas, o LBA pode fornecer informações relativamente à exposição, e à alveolite. O LBA pode ser sugestivo de agressão provocada pela inalação de partículas inorgânicas e, por outro lado, pode detetar a presença dessas partículas no parênquima (é um critério de exposição, não de diagnóstico) (6).

O aparecimento de corpos ferruginosos de forma regular, alongados e visíveis em microscopia óptica (Fig. 12) é sugestivo da presença de asbestos, mas deve ser feito o

diagnóstico diferencial com o talco, o vidro e o carvão, que formam corpos pseudo-ferruginosos, com forma mais irregular (26).

Os corpos de asbestos obtidos no LBA representam cerca de 1-2% de todos os corpos armazenados na área pulmonar abrangida pela lavagem, pelo que é possível efetuar uma estimativa da concentração destes corpos na totalidade do parênquima pulmonar (26).

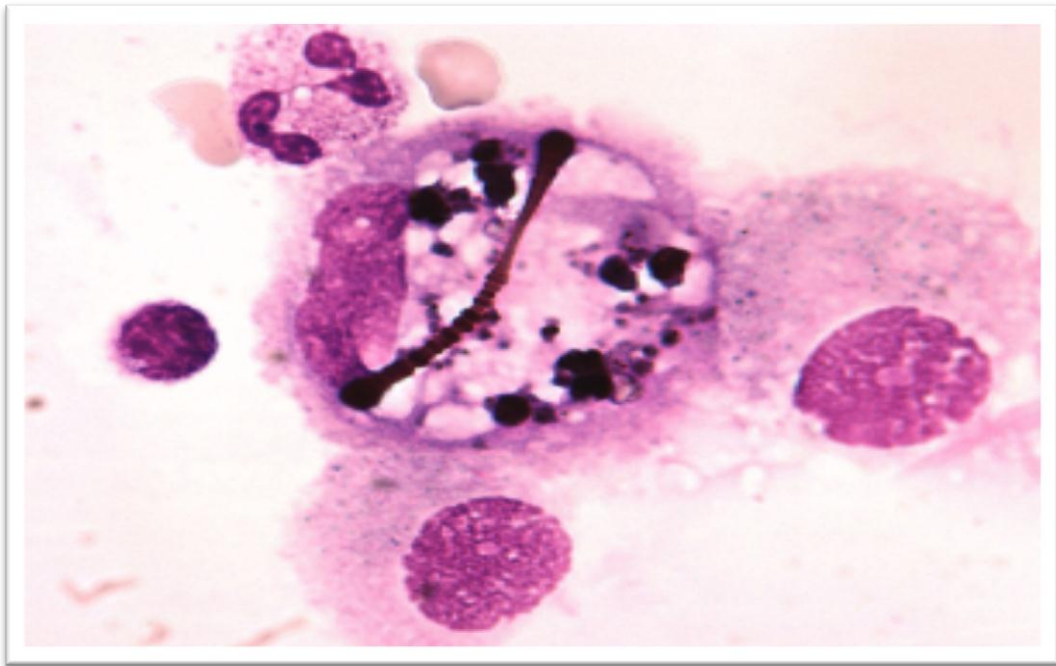


Figura 12 – Fagocitose de fibra de asbestos por macrófago alveolar (*Retirado de Silveira , 1997*).

Não está definida a relação da alveolite com a clínica, existindo resultados controversos. Na asbestose é frequente a existência de uma alveolite neutrofílica podendo, também, coexistir linfocitose e/ou eosinofilia. Em alguns casos, ocorre linfocitose com uma relação CD4/CD8 aumentada, em doentes apenas expostos e sem doença (84).

Nos trabalhos com metais pesados descreveram-se aumentos moderados de linfócitos, neutrófilos e eosinófilos. Também têm sido referidas como característica, a presença de células gigantes (6).

As exposições ambientais à berlíose costumam ser mal diagnosticadas por provocarem sintomas semelhantes aos da sarcoidose. Em alguns casos é difícil diferenciar as duas situações (26).

Na berlíose ocorre uma linfocitose semelhante à da sarcoidose ativa com aumento dos linfócitos T CD4+. *In vitro* o teste de transformação linfoblástica (resposta proliferativa de linfócitos ao berílio) faz diagnóstico e confirma a sensibilização e a natureza particular, da predisposição genética e hipersensibilidade, desta forma de pneumoconiose. Os linfócitos sanguíneos e os pulmonares, obtidos por LBA são expostos a sais de berílio, e as células de indivíduos sensibilizados exibem proliferação (26).

Para além das DIP, existem outras situações em que o LBA pode ter interesse como teste diagnóstico ou orientativo, como é o caso da doença de Wegener (pneumonia lipolítica do metabolismo gordo), do transplante pulmonar, da asma, do enfisema, da hemorragia pulmonar, neoplasias e infeções pulmonares (26).

II.4.10. Hemorragias pulmonares

As hemorragias pulmonares, tais como as doenças cardiovasculares podem ter uma lista interminável de causas (síndromes pulmão-rim, colagenoses, fármacos, doenças malignas, infeções e outras menos frequentes, como a hemossiderose pulmonar idiopática). A tríade de hemoptises, infiltrados nas radiografias do tórax e anemia estão presentes na maioria dos casos. No entanto a hemorragia pulmonar ativa poderá ocorrer sem estes dados. Um atraso no diagnóstico destas hemorragias pode conduzir a complicações renais ou pulmonares fatais (26).

O LBA é essencial para excluir ou confirmar uma hemorragia alveolar difusa em pacientes com infiltrados pulmonares de origem desconhecida. O aspeto macroscópico do LBA pode ser indicativo de hemorragia alveolar, devido à sua cor avermelhada que aumenta nas sucessivas alíquotas. Pode também apresentar-se com aspeto laranja-rosado, ou ter um aspeto normal translúcido (19,46). A contagem celular total e o número de macrófagos estão aumentados. Pode também encontrar-se eritrócitos livres e macrófagos alveolares com depósitos de hemossiderina, identificados através da coloração de Perls (26).

Para além da presença de numerosos eritrócitos os macrófagos alveolares apresentam pigmentos que coram de azul-escuro pelo Perls. A intensidade da hemorragia pode ser avaliada pela percentagem de macrófagos alveolares que contêm hemossiderina. Golde e seus colaboradores (1975) descreveram um índice de hemossiderina, baseado na intensidade de coloração das células com azul da Prússia, em que um *score* >50 já seria indicativo de hemorragia e um *score* > 100 corresponderia a hemorragia severa. A ausência de

hemosiderófagos não exclui a possibilidade de hemorragia alveolar recente (menos de 48 h) ou remota (mais de 12 dias) (85). É, também, de salientar que a presença de eritrócitos intactos no LBA não é, por si só, significativa de hemorragia pulmonar, uma vez que estes podem estar simplesmente relacionados com um traumatismo menor provocado durante a broncoscopia (46,19).

II.4.11. Neoplasias Pulmonares

O LBA é uma ferramenta útil no diagnóstico de cancro do pulmão difuso ou disseminado, que envolve as estruturas brônquicas que não são visíveis por broncoscopia. No cancro do pulmão as metástases nodulares podem apresentar-se como a única estrutura anormal observada através de exames imagiológicos ou lesões endobrônquicas encontradas através da broncoscopia (86).

Para detetar e classificar linfomas malignos a avaliação histológica é requerida, porém a obtenção de uma amostra de tecido representativa pode ser complexa. A localização pulmonar do linfoma de Hodgkin foi confirmada, por alguns Autores, pela identificação de células Reed-Sternberg no LBA sugerindo que este linfoma pode, em alguns casos, ser diagnosticado aquando da análise deste produto (26).

Também foi demonstrado que os pacientes com linfomas malignos apresentavam as razões de CD4/CD8 baixas no LBA e, de forma semelhante, no sangue, comparativamente com doentes com sarcoidose (87-90).

A pesquisa de sinais citológicos de malignidade obriga à utilização da coloração de Papanicolau, devendo as lâminas ser analisadas por um observador experiente. Em alguns trabalhos, a sensibilidade do LBA no cancro do pulmão oscila entre os 14 e os 70% (19,26).

II.4.12. Infecções Pulmonares

Apesar da abordagem clínica, complementada com apoios imagiológicos e laboratoriais, assumir um papel de relevo no diagnóstico das infeções respiratórias, a introdução da broncofibroscopia permitiu uma diversidade de métodos de recolha de amostras representativas de áreas respiratórias distais (26).

Nas pneumonias adquiridas na comunidade a broncoscopia e outras técnicas associadas assumem interesse diagnóstico perante quadros clínicos graves ou insucessos terapêuticos. Nas pneumonias associadas à ventilação o LBA tem demonstrado ter com pouco valor diagnóstico (13).

Em doentes imunocomprometidos o estudo do LBA deve ser considerado sempre que não há resposta ao tratamento e quando os métodos de diagnóstico menos invasivos não identificaram o agente etiológico da infecção (91,92).

Nas infecções oportunistas o LBA é frequentemente requerido. Quando existe uma elevada deterioração e doença pulmonar difusa, após terapia imunossupressora, é essencial fazer a exclusão de infecção bacteriana, através da análise do LBA (72).

Como alternativa pode recorrer-se ao escovado brônquico protegido. Em infecções fúngicas ou provocadas por micobactérias estes testes permitem uma precocidade diagnóstica e facilitam a introdução atempada de terapêutica correta (tabela 3) (46):

Tabela 6 - Patologias em que o lavado broncoalveolar tem valor de diagnóstico (A) e funciona apenas como complemento de outros diagnósticos (B). (*Adaptado de Silveira, 1997*).

A) Valor diagnóstico	Complemento de diagnóstico
<i>Pneumocystis</i>	<i>Herpes simplex</i>
<i>Toxoplasma</i>	<i>Cytomegalovirus</i>
<i>Strongyloides</i>	Bactérias
<i>Legionella</i>	Micobactérias atípicas
<i>Histoplasma</i>	<i>Aspergillus</i>
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Candida</i>
<i>Mycoplasma</i>	<i>Cryptococcus</i>
Vírus influenza	
Vírus sincicial respiratório	

III. Material e Métodos

III.1. Receção, acondicionamento e transporte de amostras

As amostras de LBA foram colhidas e transportadas em gelo e em 3 seringas graduadas e vedadas com rolha de rosca, sendo aceitável um período de 3 horas entre a colheita e a receção. O LBA deve ser mantido em gelo, dado que as células não se conservam bem em solução salina. No entanto, pode ser transportado à temperatura ambiente se for processado até 1 hora após a recolha, para que não ocorra perda de viabilidade celular, nem crescimento bacteriano contaminante. Após a receção o LBA é observado, macroscopicamente e microscopicamente, sendo efetuada a determinação de diferentes contagens celulares. Nas amostras que apresentaram linfocitose foi determinada a razão CD4/CD8, recorrendo a técnicas de CF (8,15,19,23) (Fig. 13).

Apesar do meio em que as células são recuperadas, para estudo do LBA, ser principalmente salino, as secreções extracelulares dos alvéolos e vias aéreas distais também contribuem para o aumento da salinidade do meio, que é constituído por cerca de 0.06 mg/L de proteínas (albumina, α 1-antitripsina, α 2-macroglobulin e proteínas libertadas localmente, como a mieloperoxidase, lactoferrina, elastase e fibronectina) e 40 μ g/mL de glucose. Como o líquido recuperado contém nutrientes adequados para manter as células viáveis por algum tempo, não são necessários suplementos durante o transporte. A lidocaína, usada para diminuir a tosse, também pode estar presente no líquido recuperado (8 a 12 mmol/L) embora, nestas concentrações, não interfira na atividade celular (8,19,20,22,23,93).

O material da primeira seringa, obtido durante a broncofibroscopia, não é enviado para análise porque contém sobretudo o fluído da árvore brônquica, sendo o seu aspeto espumoso, devido ao surfactante. A presença de sangue, fragmentos de material mucóide ou fibrina no LBA não invalidaram a execução do estudo (8,15,19,23).

Alguns Autores referem o interesse da utilização de azul de Tripiano para o estudo da viabilidade celular, mas esta não foi controlada neste estudo. Este corante entra apenas nas células permeabilizadas (inviáveis) corando de azul os seus núcleos. O estudo da viabilidade celular serve como um controlo de qualidade da técnica e do transporte da amostra. Nos casos em que a viabilidade celular seja inferior a 85% a interpretação dos resultados deverá realizar-se com cautela. O conhecimento da viabilidade celular é imprescindível nos casos em que se realizam estudos funcionais nas células obtidas no LBA (94, 95).

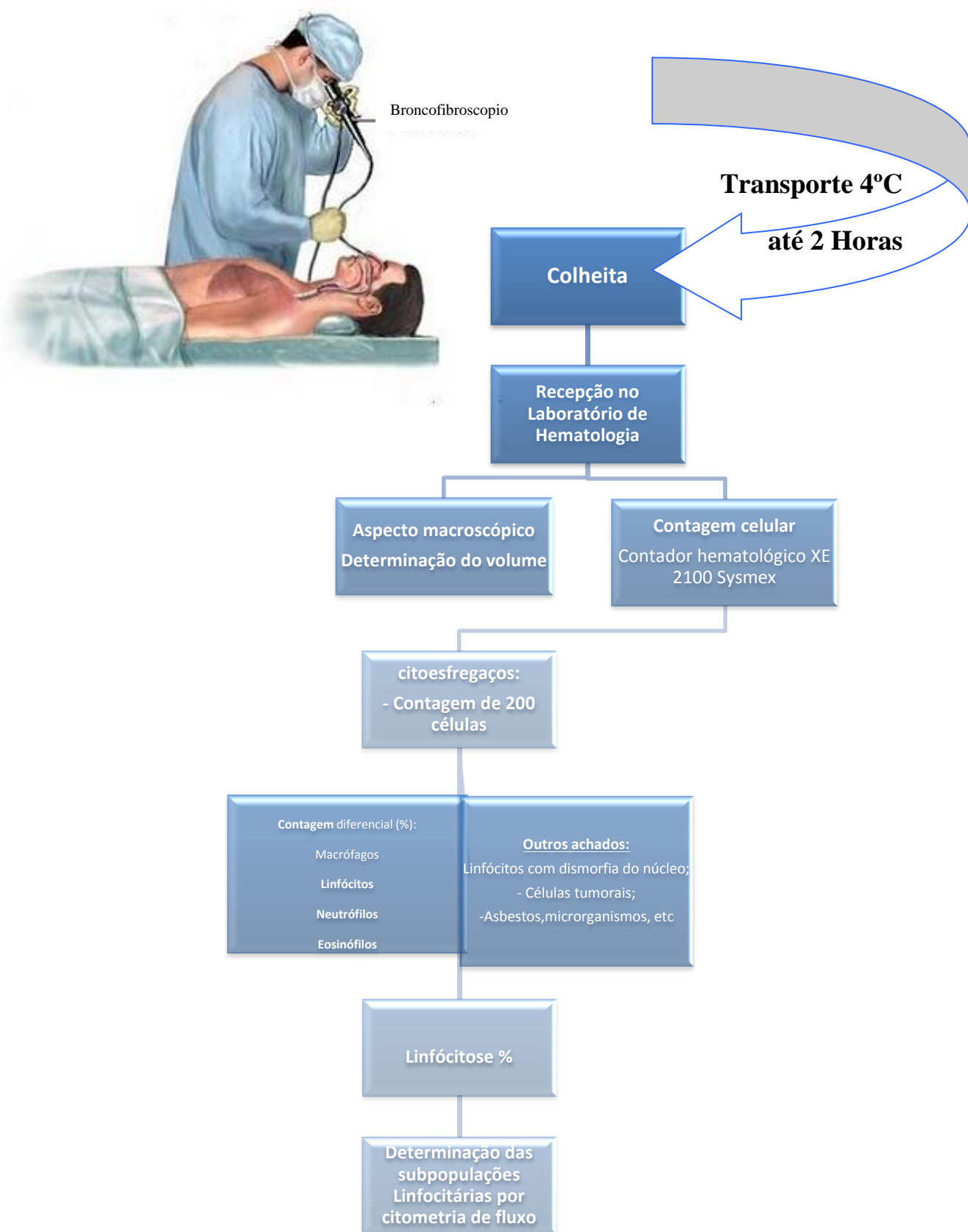


Figura 13 - Estudo do lavado broncoalveolar. Sequência dos procedimentos analíticos.

III.2. Critérios de rejeição de amostras

Não existem critérios claros para determinar se uma amostra está ou não em condições apropriadas para ser processada. No entanto, há certos aspetos que devem ser tidos em conta de forma a poderem obter-se resultados credíveis tais como: amostra que contenha menos de 2×10^9 células/mL de LBA, existência de um número excessivo de células epiteliais ($> 5\%$) com alterações morfológicas degenerativas ou excedendo o número de macrófagos alveolares), presença de exsudado leucocitário mucopurulento, excesso de eritrócitos (devido a trauma resultante da broncoscopia), e alterações degenerativas ou artefactos que dificultem a identificação celular (96).

III.3. Aspeto macroscópico e determinação do volume

Antes do processamento do LBA anota-se o seu aspeto macroscópico. A amostra, obtida em indivíduos saudáveis, apresenta um aspeto esbranquiçado e espumoso. Nos pacientes fumadores o líquido pode ter uma tonalidade acastanhada, que corresponde às células carregadas de material rico em carbono. A presença de sangue, geralmente, é devida à broncofibroscopia mas, também, pode aparecer em casos graves de hemorragia pulmonar difusa. O aspeto leitoso sugere a existência de PA (96).

O conteúdo das 3 seringas é misturado e o volume total é medido. Frequentemente, o LBA contém grandes quantidades de muco, pelo que deve ser passado através de uma gaze esterilizada, com o objetivo de prevenir a mistura desse material com o sedimento obtido após centrifugação. Se o LBA contém muito muco ou outro tipo de material visível deve filtrar-se com gaze de algodão. Uma das preocupações com a filtração do LBA deve-se ao facto de poder haver perda seletiva de células, por aderência à gaze, especialmente se a amostra contiver células ativadas. Demonstrou-se, ainda, que a filtração induz algumas modificações tais como a eliminação significativa de células epiteliais brônquicas. Não altera a quantidade de proteínas, nem a distribuição de neutrófilos e eosinófilos, mas pode haver perda de linfócitos. Permite também uma melhor contagem de células, por evitar a formação de agregados (90-92,94).

III.4. Contagens celulares

O número total de leucócitos recuperados no LBA foi determinado pela análise de uma alíquota da amostra, em contador hematológico (Modelo Sysmex XE 2100TM). Foram também determinados os valores absolutos de cada uma das linhagens celulares. O método permite conhecer o número de células efetoras existentes nas estruturas alveolares e, apesar de não existir um volume padronizado de líquido instilado e recuperado, a contagem diferencial e a contagem celular total são as determinações mais praticadas na rotina laboratorial.

As contagens celulares são mais precisas quando realizadas na amostra original e antes de qualquer lavagem, com tampão de fosfatos (PBS), pois esta origina perda celular e diminuição da viabilidade (96).

Na contagem diferencial cada tipo celular é apresentado em % do total de células recuperadas. Estes valores (granulócitos, linfócitos e macrófagos alveolares) apuram-se contando 200 células ao microscópio óptico, em campos aleatórios e em lâminas coradas com corante de Leishman.

O estudo da morfologia e da distribuição celular é, também, essencial para se distinguir as amostras úteis das que não são representativas do pulmão profundo. Estas últimas caracterizam-se por um escasso número de macrófagos, presente em menor percentagem que as células epiteliais ciliadas bronquiolares, pela presença de aglomerados mucopurulentos, com acumulação de grande quantidade de neutrófilos ou por um número excessivo de eritrócitos. Os eritrócitos e as células epiteliais devem ser mencionados, mas não são incluídos na contagem celular total (95,96).

Para a realização da contagem diferencial realiza-se um espalhamento de células numa lâmina de vidro, que tem como principal objetivo a identificação das mesmas, que são projetadas numa zona circular e bem delimitada da lâmina, ficando distribuídas de forma homogênea e em monocamada. A baixa rotação da citocentrífuga minimiza a destruição e desintegração celulares bem como a perda seletiva de linfócitos. Esta técnica permite a detecção de alterações que possam, ocasionalmente, contribuir para o diagnóstico (95,96).

A maioria dos Autores utiliza a coloração Diff-Quik, ou de May-Grunwald-Giemsa (15,46,94). Para este trabalho foi realizada a coloração de Leishman, técnica simples e de rápida execução que demora cerca de 10 minutos enquanto que a coloração May-Grunwald-Giemsa tem uma duração de cerca de 25 minutos. Paralelamente à contagem diferencial devem observar-se outros tipos celulares tais como células plasmáticas, neoplásicas, com anomalias

citoplasmáticas ou nucleares, do epitélio brônquico ou bucal, presença de muco, células destruídas, eritrócitos, agregados de pneumócitos do tipo II, e de *P.jiroveci* e, também outros microrganismos e partículas inorgânicas tais como asbestos ou corpos derivados do carvão. É importante precisar as características especiais de algumas células, nomeadamente núcleos irregulares dos linfócitos, aspeto espumoso de alguns macrófagos, linfócitos ativados e pneumócitos reativos do tipo II (Tabela 7) (16,95).

Metodologia

O conteúdo das seringas foi misturado, homogeneizado e passado por 2 gazes esterilizadas, bem esticadas, através de um funil de vidro, para uma proveta graduada, anotando-se o seu volume, em mL.

Do volume total separou-se uma alíquota para um tubo de hemograma (2,7 ml aproximadamente) e procedeu-se à contagem celular total, no contador automático Sysmex XE-2100, registando-se o número de leucócitos /mL de LBA recuperado.

Em seguida, realizaram-se dois citoesfregaços identificaram-se as lâminas e adaptaram-se ao suporte metálico para citofunis, com a parte esmerilada para fora. Colocou-se o papel absorvente do citofunil sobre as lâminas, de modo a que a extremidade aberta dos citofunis ficasse para fora, e acoplou-se o suporte metálico, originando-se um sistema único. Pipetaram-se 3 gotas de LBA para o citofunil e foi efetuada uma citocentrifugação a 800 rpm, durante 5 minutos. As células presentes na amostra ficaram concentradas numa zona circular e o excesso de líquido foi absorvido pelo papel de filtro. Retiraram-se as lâminas do suporte metálico e separaram-se dos citofunis, sem danificar o citoesfregaço.

Após secagem breve, as lâminas foram coradas com corante de Leishman, durante 1 minuto e, em seguida, cobertas com água tamponada (pH 6,6), durante 10 minutos, homogeneizando-se a mistura até surgir um brilho metálico. Os resultados da contagem dos diferentes tipos de células presentes efetuadas num total de 200 foram expressos em percentagem.

Tabela 7 - Perfis celulares do lavado broncoalveolar de doenças do interstício pulmonar. (Adaptado de *World Association of Sarcoidosis and Other Granulomatous disorder*, 2011).

	Macrófagos alveolares espumosos	Linfócitos	Neutrófilos	Eosinófilos	Plasmócitos	Mastócitos	Pneumócitos reativos do tipo II
Sarcoidose		↑	=	=/↑	-	=/↑	-
Alveolite alérgica extrínseca	+	↑↑	↑	=/↑	+/-	↑↑	-
Pneumonite induzida por fármacos	+	↑↑	↑	↑	+/-	↑↑	-
FPI*		↑	↑/↑↑	↑	-	↑	+/-
BOPO**		↑	↑	↑	+/-	=/↑	
Pneumonia eosinofílica		↑	=	↑↑	+/-	=/↑	
Proteínose alveolar	+	↑	=	=	-	=	
Hemorragia alveolar difusa		=/↑	↑	=/↑	-	=	+/-
SARD***		↑	↑↑	↑	-	=/↑	+/-
Neoplasias hematológica		↑	↑	=/↑	-	=/↑	
Asma		=	=	↑	-	=	
<u>Doenças infecciosas:</u>							
Pneumonia associada a ventilação mecânica		=	↑↑	=	-	=	+/-
Pneumonia por <i>P.jiroveci</i>		=/↑	↑	=/↑	+/-	=	+/-
Pneumonia viral		=	↑↑	=	-	=	+/-

* FPI – Fibrose pulmonar idiopática; ** BOPO: bronquiolite obliterante com pneumonia organizativa; *** SARD -síndrome de angústia respiratória do adulto.

As células que predominaram na contagem diferencial das diferentes alveolites foram os macrófagos alveolares (Fig. 7) (95).

III.5. Determinação das subpopulações linfocitárias por citometria de fluxo

A CF começou a ser difundida no início dos anos 70, com a comercialização dos primeiros citómetros e a sua utilização era exclusiva da investigação, devido aos elevados custos e à complexidade do seu funcionamento, sendo necessários técnicos especializados para a sua execução. Só na década de 80 é que o seu uso na prática laboratorial se tornou mais frequente (97-100). É uma técnica multiparamétrica que utiliza Acs monoclonais marcados com fluorocromos para analisar, qualitativa e quantitativamente, Acs específicos dos Acs utilizados (101).

III.5.1. Fundamento

O citómetro recorre à focagem hidrodinâmica para garantir que as células se movimentam, uma de cada vez, ao longo da câmara de fluxo, ao mesmo tempo que são atravessadas por um feixe de luz laser. Desta forma, podem detetar-se até 10.000 células (eventos) por segundo.

O citómetro de fluxo utilizado neste trabalho, para a determinação das subpopulações linfocitárias do LBA (Beckman Coulter modelo FC 500), mede simultaneamente as dispersões frontal e lateral, utilizando um ou dois lasers (488nm e/ou a 635 nm ou a 633 nm) permitindo efetuar análises multiparamétricas e obter várias informações celulares na mesma amostra. Obtém-se dados sobre as propriedades intrínsecas ou físicas das células, como o tamanho e a complexidade interna (granulosidade e configuração nuclear) e informações relacionadas com a deteção de um ou mais Acs citoplasmáticos, nucleares ou de superfície (99,100).

A imunofluorescência utiliza fluorocromos conjugados com ligandos (Ac monoclonais, lectinas ou citocinas) que se fixam diretamente às estruturas celulares dentro e/ou fora da célula. É utilizado um laser, como fonte de luz monocromática, que proporciona uma baixa divergência e alta fluorescência dos sinais emitidos. Estes fluorocromos são excitados pela luz incidente do laser e emitem a um comprimento de onda diferente da do citómetro (comprimento de onda de emissão). Muitos aparelhos são capazes de usar dois ou mais feixes laser, simultaneamente, para excitar uma vasta gama de fluorocromos (102). A fluorescência tem propriedades espectrais específicas dos diferentes fluorocromos utilizados (Tabela 8):

Tabela 8 - Espectros de excitação e de emissão de fluorocromos (*Adaptado de Lorenzi, 2006*).

Fluorocromos	λ Excitação (nm)	λ Emissão (nm)
Fluoroscéinaisotiocianato (FITC)	468-509	504-541
Ficoeritrina (RD1)	486-580	568-590
Ficoeritrina CY5 (PC5)	486-580	660-680
Ficoeritrina Texas Red (ECD)	486-580	610-635

A maioria dos ensaios utilizou dois ou mais fluorocromos, simultaneamente, de forma a avaliar diferentes características das células. Cada fluorocromo deverá ter um comprimento de onda de emissão distinto, para que não ocorra interferência com outros. O citómetro de fluxo é constituído por quatro sistemas principais: fluido, óptico, eletrónico e computador. O sistema fluido permite a introdução e subsequente restrição das células a serem estudadas a uma fila única, sendo estas intersectadas pelo feixe de laser, num processo que se designa por focagem hidrodinâmica (Fig.14). A câmara de fluxo contém um canal retangular onde entra uma corrente pressurizada de fluido e onde é injetada uma corrente da amostra, não havendo mistura das duas de forma que as células fluam através do feixe de laser alinhadas para que possam ser avaliadas individualmente (99).

O sistema óptico é capaz de gerar e recolher os sinais de luz. É constituído pela fonte luminosa (laser) e por lentes e espelhos. Os sinais emitidos são enviados em diferentes direções através de espelhos que separam e direcionam os diferentes comprimentos de onda, para os respetivos detetores. Estes, são capazes de captar informações sobre o tamanho e a granulação celular. A dispersão da luz é um processo físico em que uma célula interage com a luz incidente, mudando a sua direção (99).

As características celulares que contribuem para a dispersão da luz são o tamanho, a membrana, o núcleo e o material granular contido no interior da célula. A luz não se dispersa de igual forma em todas as direções. Quando a dispersão de luz é medida em ângulo reto (90°) é chamada de dispersão lateral ou *side scatter* (SS) e está correlacionada com a complexidade interna da célula (99).

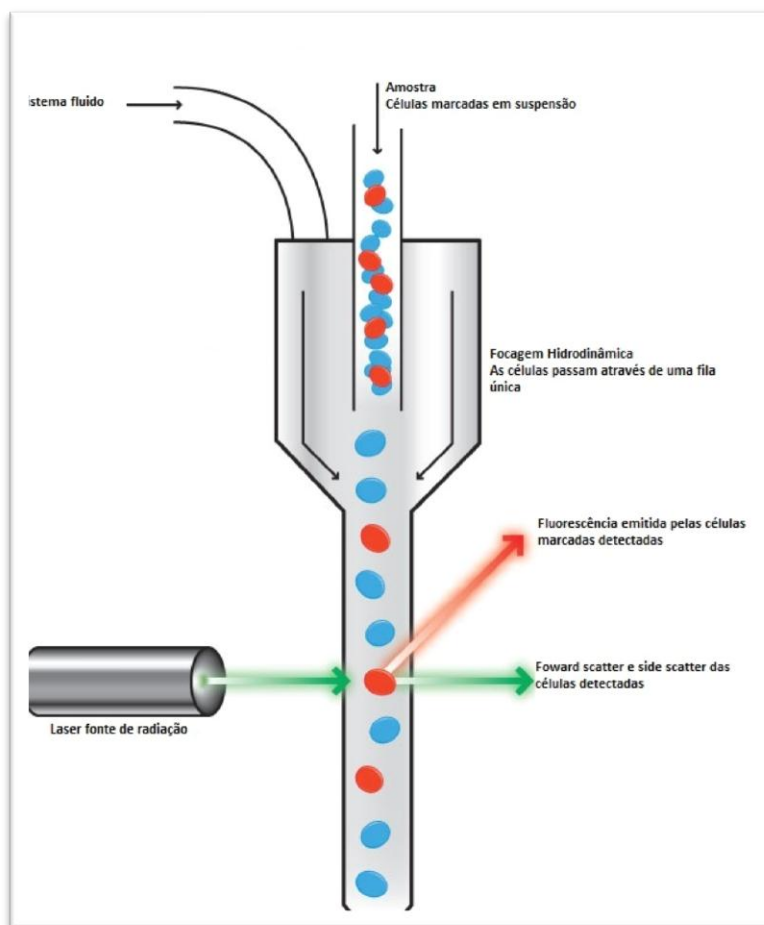


Figura 14 - Focagem hidrodinâmica (Adaptado de <http://www.abcam.com/index.html>).

Quando a dispersão da luz é medida em ângulos pequenos (1° a 10°) é chamada de dispersão frontal ou *forward scatter* (FS) e é proporcional ao tamanho da célula que provocou essa dispersão. As células também emitem luz fluorescente em todos os ângulos, relativamente ao eixo do feixe de laser (99).

O sistema eletrônico transforma os sinais fluorescentes emitidos pelas células (sinais ópticos) em sinais eletrônicos, que são recolhidos, digitalizados e apresentados pelo computador num formato que seja facilmente interpretável pelo utilizador.

A luz encontra os tubos fotomultiplicadores ou fotodiodos que convertem a luz incidente em pulsos elétricos. Os sinais luminosos, amplificados e convertidos em pulsos elétricos pelos detetores são então medidos e sofrem uma conversão analógica-digital. Os sinais digitalizados são processados por analisadores sendo possível a sua acumulação em sinais em tempo real, sob a forma de histogramas mono ou biparamétricos, que são visualizados no monitor do

computador. Podem observar-se simultaneamente, as distribuições da frequência e /ou intensidade de fluorescência de cada parâmetro celular (densidade antigénica) (99,100).

O computador, acoplado ao citómetro, é responsável pela aquisição, armazenamento e análise dos dados obtidos. Na análise de dados usa-se a janela eletrónica que agrupa células com características semelhantes, permitindo o isolamento e análise da população nela delimitada. O computador elabora gráficos e histogramas, divididos em regiões de parâmetros de fluorescência denominadas FL1, FL2, FL3, FL4, etc., que possibilitam a análise de populações celulares diferentes, dentro de uma mesma amostra, desde que marcadas com fluorocromos distintos. Os citómetros mais sofisticados podem possuir até 16 detetores em simultâneo (radiação dispersa e fluorescente), o que permite analisar múltiplas características celulares e/ou componentes de um elevado número de células, de forma individual. Esta versatilidade designa-se por análise multiparamétrica (102,103).

III.5.2. Imunofenotipagem

A utilização de Ac monoclonais com alta especificidade para determinantes antigénicos encontrados nas células, conduziu à categorização de inúmeras moléculas da superfície celular, intracitoplasmáticas ou nucleares. Esta identificação, contribuiu de modo marcante para a compreensão das alterações fisiológicas, que surgem durante a diferenciação e maturação dos componentes normais do sistema hematopoiético, assim como daquelas que surgem durante o desenvolvimento de processos patológicos (99,100).

A CF tem evoluído rapidamente nos últimos anos e as suas aplicações são amplas, tanto em laboratórios de investigação como nos de rotina clínica, nas diversas áreas da imunologia, hematologia, oncologia, anatomia patológica e biologia celular. A técnica oferece objetividade, sensibilidade, rapidez e precisão na análise das características celulares, incluindo o conteúdo de ADN/ARN, a deteção e quantificação de Ag celulares, o controlo da resistência celular a drogas e a análise do conteúdo citoplasmático. Esta técnica também permite o estudo do ciclo celular, a determinação da ploidia do ADN em neoplasias, a concentração do Ca^{2+} , o pH intracelular, a apoptose e a necrose (99).

O sistema TetraOneSYSTEM Software em conjunto com reagentes monoclonais CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5 e CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5 permite a análise automatizada das subpopulações linfocitárias, dependendo da capacidade de um Ac monoclonal se ligar à superfície de células que expressem

determinantes antigénicos. A marcação celular consiste na incubação de uma amostra de LBA, com o reagente. Os reagentes tetraCHROME CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5 e CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5 são constituídos, cada um, por uma combinação de quatro Ac monoclonais conjugados com fluorocromos específicos.

Os eritrócitos são lisados pelo reagente COULTER IMMUNOPREP™ ReagentSystem. Os leucócitos remanescentes são analisados por CF utilizando janelas de linfócitos previamente delimitadas.

No primeiro histograma, para qualquer reagente, a janela de linfócitos é identificada por ter uma fluorescência brilhante CD45+ FITC e baixo Side Scatter (SS). Durante a aquisição as células atravessam o laser e dispersam a sua luz e as células coradas emitem fluorescência. Os sinais da dispersão e da fluorescência detetados pelo instrumento fornecem informação sobre o tamanho celular, a complexidade interna, a intensidade relativa da fluorescência e a percentagem de cada subpopulação de linfócitos. O Ac anti-CD19 marca os linfócitos B, o anti-CD45 é um marcador PAN-leucocitário, marca todos os leucócitos. A combinação do Ac anti-CD16 com o Ac anti-CD56 marca os linfócitos *natural killer* (NK). O Ac anti-CD16 também marca neutrófilos e o Ac anti-CD3 marca os linfócitos T. O Ac anti-CD4 (CD4) marca os linfócitos T helper e o Ac anti-CD8 (CD8) marca os linfócitos T citotóxicos (102).

III.5.3. Metodologia

Material Utilizado

Na determinação das subpopulações linfocitárias os equipamentos utilizados para a preparação das amostras foram o TQ Prep™ e o PrepPlus™, ambos fornecidos pela BeckmanCoulter (Izasa) e um vórtex. Para a aquisição e análise de amostras foi utilizado o citómetro de fluxo Modelo Fc 500 (BeckmanCoulter).

Os materiais utilizados para a preparação de amostras foram: tubos de plástico com de fundo redondo de 10 mL, pipetas de plástico de 3 mL, tubos de plástico com fundo redondo e de 10 mL, tubos de plástico de 5 mL e tubos de plástico com fundo cónico.

Os reagentes utilizados na execução da técnica foram os seguintes: tetraCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5, tetraCHROME CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5 (CYTO-STAT®tetraCHROME™), IMMUNOPREP™ e PBS.

Métodologia

Após a contagem total e diferencial das células do LBA homogeneizou-se o restante volume de amostra e distribuiu-se por vários tubos de plástico (10 mL, fundo redondo) que foram tapados e centrifugados a 1800 rpm, durante 5 minutos. Após centrifugação decantaram-se os tubos por inversão. Juntou-se ao 1º tubo cerca de 1 a 2 mL de PBS, homogeneizou-se e transferiu-se esta suspensão para o tubo seguinte de forma a ressuspender o sedimento obtido, repetindo-se este procedimento pelos tubos seguintes até chegar ao último. Centrifugou-se o último tubo da suspensão contendo a totalidade do material, durante 5 minutos e a 1800 rpm.

Ressuspendeu-se o sedimento celular obtido em 1 a 2 mL de PBS e transferiu-se para um tubo de hemograma, ficando desta forma disponível para processamento.

O preparador automático PrepPlus™ pipetou 10µL do reagente monoclonal CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5 para um tubo de plástico e 10µL de reagente monoclonal CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5 para um segundo tubo de plástico. Em ambos os tubos foram colocados 100 µL da amostra, previamente preparada. As amostras foram homogeneizadas no vórtex durante uns segundos, depois colocaram-se no escuro, durante 15 e à temperatura ambiente. Após a incubação as amostras foram introduzidas no preparador automático TQ Prep™, onde foram tratadas com o reagente de lise (IMMUNOPREP™) para destruir os eritrócitos, obtendo-se assim os leucócitos para posterior análise por CF.

Adquiriram-se 100.000 células de cada suspensão para análise no citómetro. Utilizou-se a solução de PBS, por não conter iões de cálcio nem de magnésio e minimizar a agregação celular. Com as repetidas ressuspenções celulares, estima-se que ocorra perda de células durante o processamento (+/- 25%). Aconselha-se a utilização de tubos de plástico ou de silicone para evitar perda de células, uma vez que a utilização de material de vidro favorece a adsorção das mesmas à sua superfície (7,96).

III.6. Subpopulações linfocitárias em doenças do interstício pulmonar

A determinação do fenótipo das células T presentes no pulmão e obtidas no LBA é frequentemente, utilizada para avaliação de causas das DIP. A determinação da razão CD4+/CD8+, por imunofluorescência, imunoperoxidase ou coloração de citoesfregaços implica técnicas trabalhosas e está sujeita a várias interpretações. As principais indicações para a realização da imunofenotipagem de linfócitos no LBA são as situações em que ocorre aumento da contagem de linfócitos, tais como a sarcoidose, a PH, a berlíose, a tuberculose, as doenças induzidas por fármacos, a asbestose, algumas doenças do colagénio e infeções por VIH, pois o resultado da razão poderá ter valor diagnóstico (99,104).

IV. Resultados

IV.1. Análise Estatística

A análise estatística efetuou-se com o programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) para Windows v. 17.0 e foram utilizados os testes de Wilcoxon e Mann-Whitney.

IV.2. Estudo do lavado broncoalveolar

IV.2.1. Patologias analisadas

A informação clínica associada aos LBA analisados permitiu-nos subdividi-los em diferentes grupos, de acordo com as respetivas patologias: sarcoidose, suspeita de sarcoidose, PIND, FP, pneumonia, tuberculose, alveolite, neoplasias, LES, diversos casos e sem informação clínica (Quadro 1). Nos LBA estudados foram analisados os seguintes parâmetros: volume (em mL), razão CD4/CD8, contagens totais e diferenciais de linfócitos, neutrófilos e macrófagos. Para além das células referidas, também se observaram células epiteliais brônquicas (Fig.15).

Quadro 1- Patologias cujos lavados broncoalveolares foram estudados.

	Nº de LBA estudados
Sarcoidose	26
Suspeita de sarcoidose	13
Patologia do interstício pulmonar não diferenciada	40
Fibrose pulmonar	14
Pneumonia	7
Tuberculose	3
Alveolite	4
Neoplasias	9
Lupus Eritematoso sistémico	3
Diversos casos	39
Sem informação clínica	49
Total	207

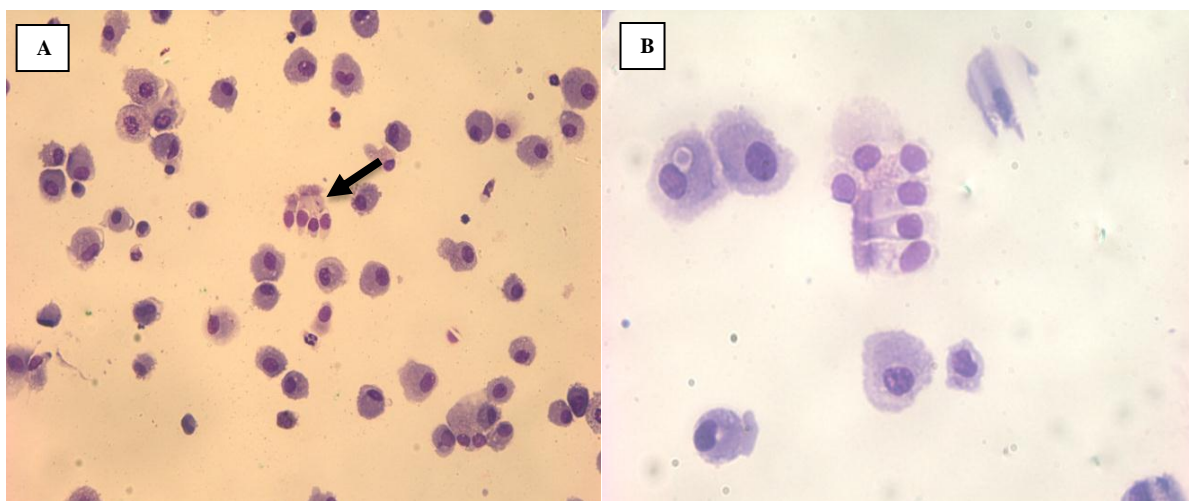


Figura 15 - Células epiteliais brônquicas (➡), em lavado broncoalveolar, com contagem celular total de $102 \times 10^6/\text{mL}$. Ampliação de 400x (A) e ampliação 1000x (B). Coloração de Leishman.

O grupo sem informação clínica associada foi o mais representativo (23,77%), da totalidade dos LBA analisados, seguindo-se o das PIND (19,3%), o “diversos casos” representado por 18,8% e a sarcoidose (12,6 %). O grupo das neoplasias (4,4%) incluiu 1 do pulmão, 1 do mediastino e 7 de origem hematopoiética. No grupo das pneumonias (3,5%) constavam 2 casos de PE, 1 por adenovírus e 4 adquiridas na comunidade. O subconjunto “diversos casos”, que incluiu 39 LBA (18,8%), apresentou informação clínica variável, nomeadamente alterações imagiológicas, tosse, nódulos pulmonares, hipereosinofília pulmonar, esclerodermia, conectivite, asbestose, vasculite, doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC) e insuficiência respiratória (Fig.16). Alguns destes casos, tais como a asbestose, a esclerodermia, a vasculite, a conectivite e a hipereosinofília pulmonar seriam interessantes para realizar estudos mais completos do LBA.

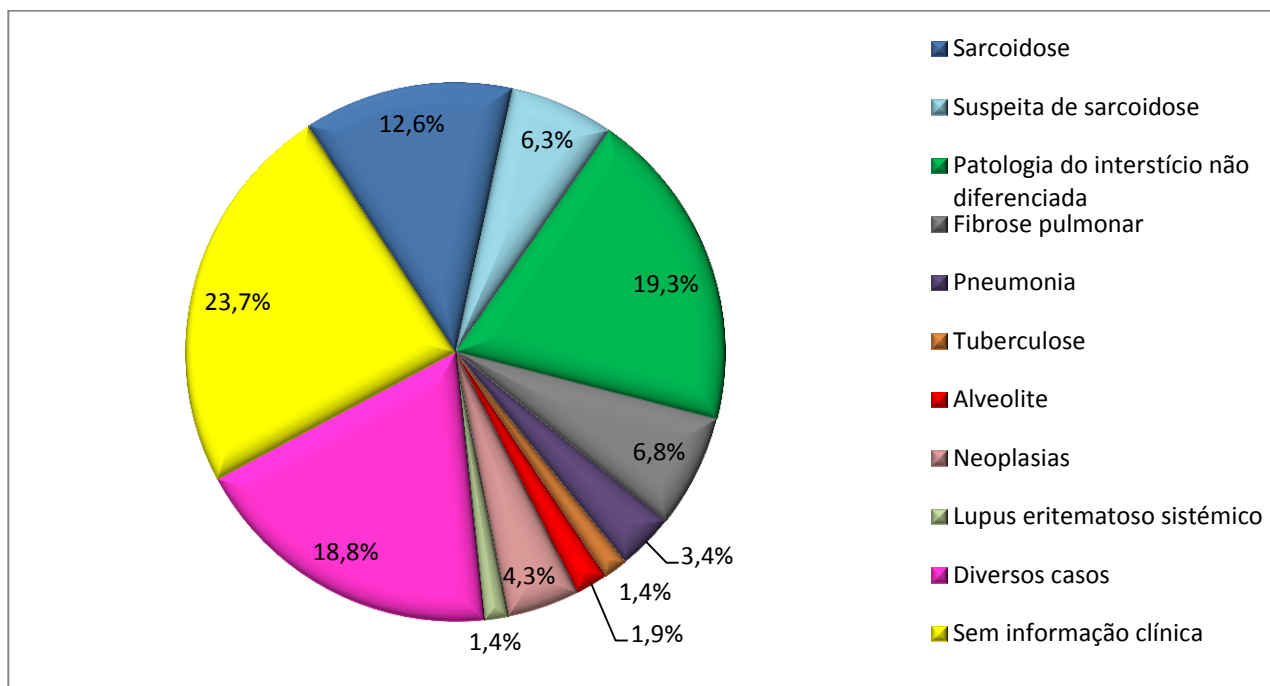


Figura 16 - Situações patológicas cujos lavados broncoalveolares foram analisados.

Para a totalidade dos LBA analisados (n=203) o valor médio, obtido para a contagem celular foi de $407 \times 10^6/\text{mL}$. Encontraram-se valores médios de 70,3% para os macrófagos alveolares, de 14,7% para os linfócitos, de 10,2% para os neutrófilos e de 2,4% para os eosinófilos (Fig. 17). Para a razão CD4/CD8 foi obtido um resultado médio de 6,9 (n=68).

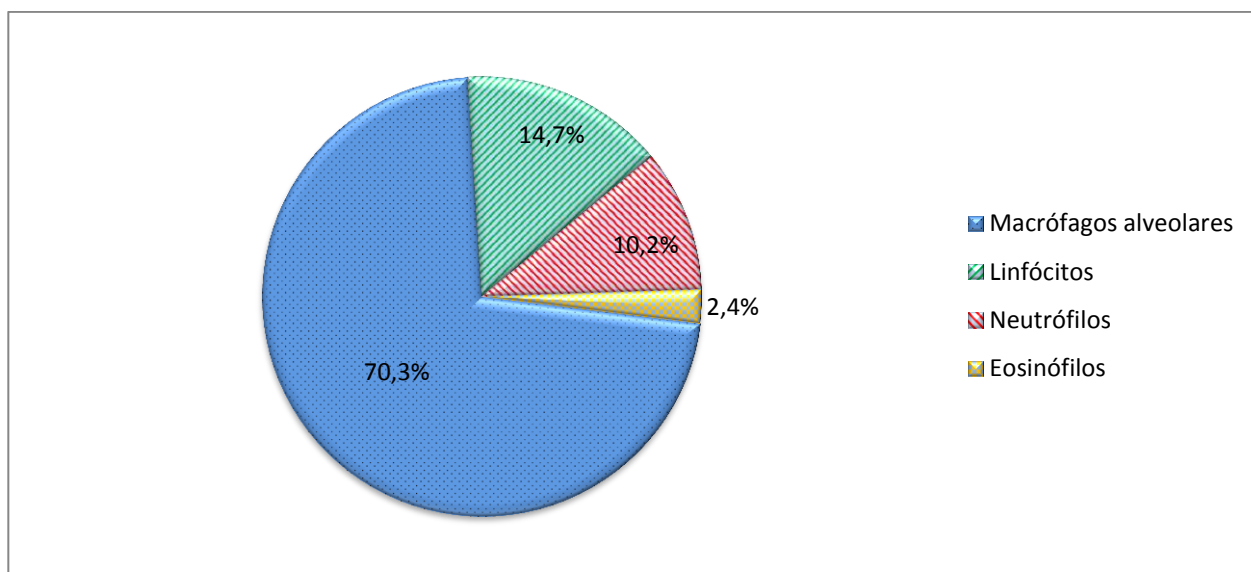


Figura 17 - Valores percentuais médios das células dos lavados broncoalveolares analisados.

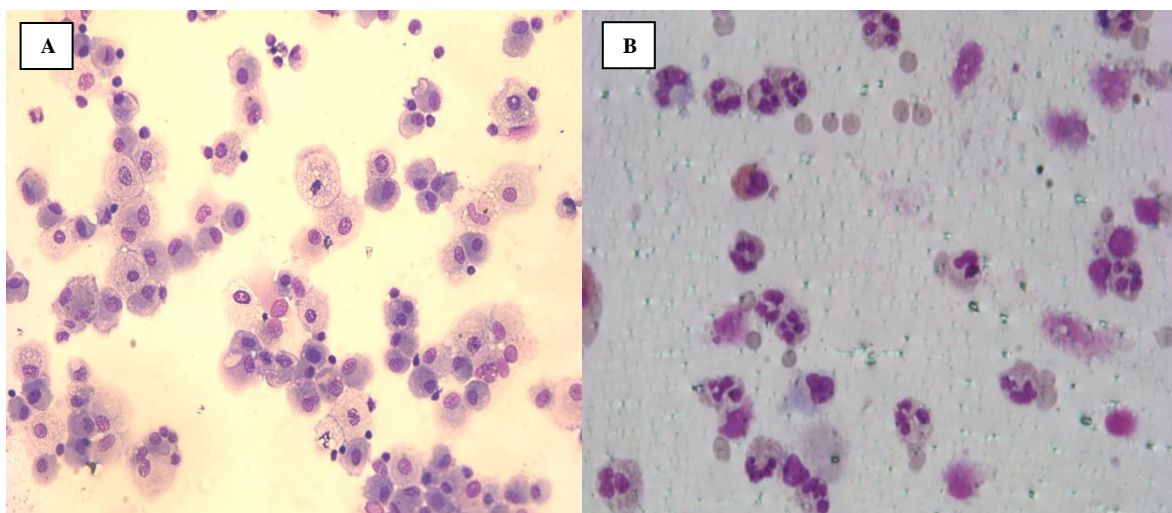


Figura 18 - Lavado broncoalveolar de indivíduo normal (92 % de macrófagos), com ampliação de 400x (A) e amostra com 27% de neutrófilos e ampliação de 1000x (B). Coloração de Leishman.

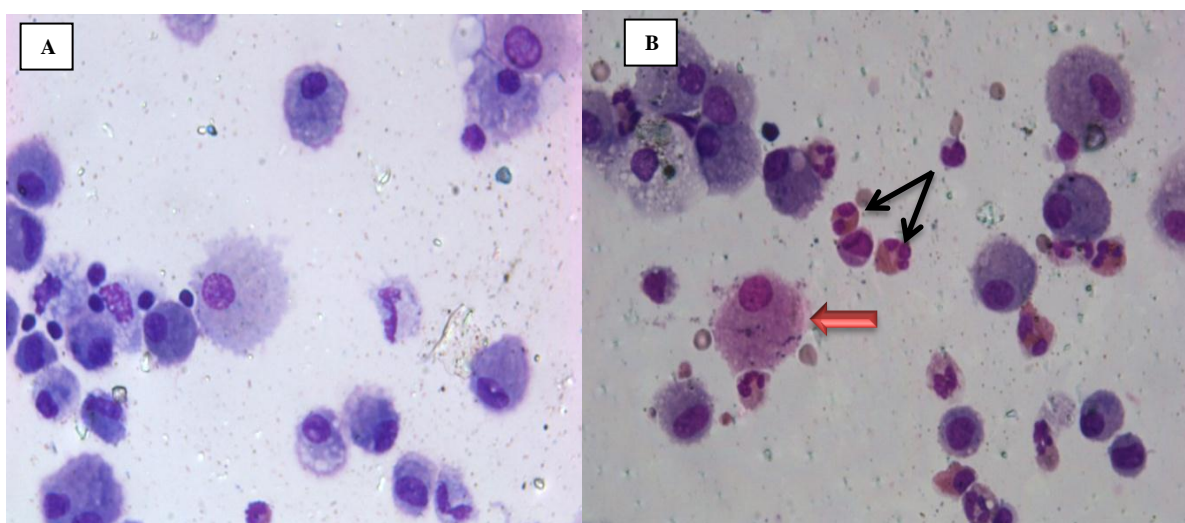


Figura 19 - Lavado broncoalveolar de amostra normal (91% de macrófagos) (A) e com eosinofilia (48% de eosinófilos). Eosinófilos (→) e plasmócitos (←) (B). Ampliações de 1000x e coloração de Leishman.

Como controlo normal foram usados valores médios de Autores, que analisaram o LBA de indivíduos saudáveis. Foi encontrada uma grande variabilidade de resultados entre os diferentes Autores referenciados, tal como aconteceu neste estudo. Foi realizada uma média dos valores encontrados, obtendo-se assim o valor usado como controlo normal ($116,3 \times 10^6/\text{mL}$) (21;30,31).

Nos esfregaços de LBA normal, por vezes, foram observados macrófagos alveolares com inclusões citoplasmáticas designadas por “inclusões de fumador” (Fig.20).

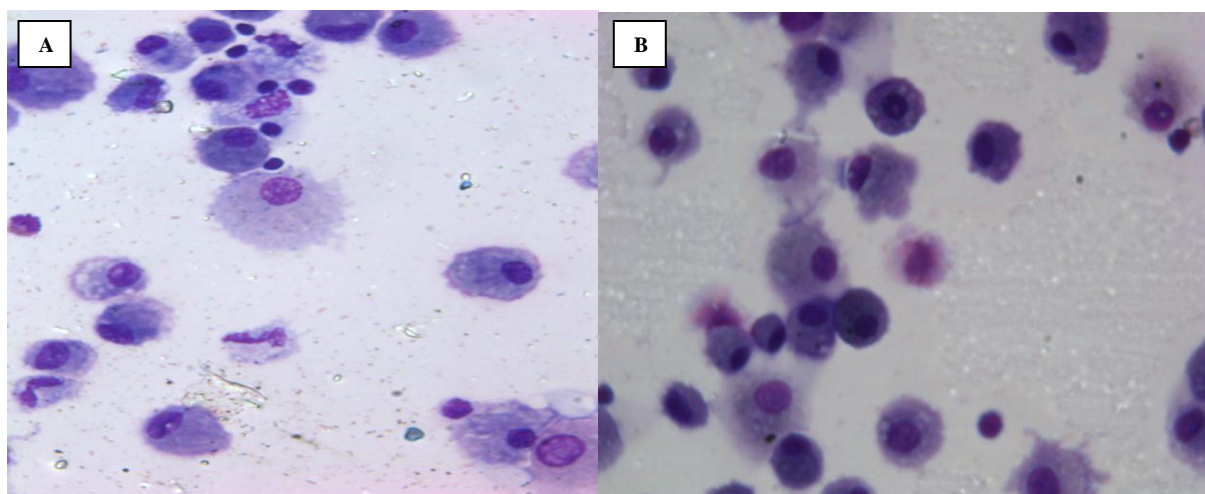


Figura 20 - Lavado broncoalveolar de individuo normal (110×10^6 células/mL) (A) e de fumador (345×10^6 células/mL) com 93% de macrófagos alveolares, mais escurecidos e com inclusões no citoplasma (B). Ampliações de 1000x e coloração de Leishman.

IV.2.2. Doenças do interstício pulmonar

IV.2.2.1. Volume recuperado e células/mL obtidas

Foi observada uma grande variação nos volumes de LBA rececionados no laboratório de hematologia (de 0,5 a 100 mL).

Observou-se que quanto maior o volume recuperado, mais elevada foi a contagem do número de células/mL ($r = 0,307$) o que sugere que, nos LBA com aumento celular é possível recolher volumes mais elevados para análise (Quadro 2).

Quadro 2 – Contagem do número de leucócitos $\times 10^6$ /mL e volume de lavado broncoalveolar recuperado (mL)

Volume recuperado no LBA mL	Número de amostras de LBA	Valor médio do nº de células $\times 10^6$ /mL (LBA)
0-20	42	250,45
21-40	57	304,96
41-60	49	428,75
61-80	26	444,30
81-100	3	781,00
Total	177	

IV.2.2.2. Contagens celulares

O nº de células obtidas no LBA de doentes com DIP, pneumonia, neoplasias, tuberculose e alveolite encontram-se expressas no Quadro 3. Todas as patologias analisadas apresentaram um valor médio superior ao normal, encontrado na literatura ($116,3 \times 10^6$ células/mL). Na maioria dos casos o número de amostras estudadas para cada patologia foi inferior a 10.

Quadro 3 – Contagens celulares no lavado broncoalveolar de doenças do interstício pulmonar.

Dimensão da amostra (N)		Patologias do interstício pulmonar (DIP)	Nº de células $\times 10^6$ /mL de LBA
6	<10	Pneumonia	830,0
9		Neoplasia	247,3
3		Tuberculose	362,3
4		Alveolite	352,3
3		LES	802,3
39	>10	Sarcoidose/suspeita sarcoidose	297,4
40		PIND	343,9
14		Fibrose Pulmonar	421,5

Os valores obtidos para o nº de células totais foi de 830×10^6 /mL para os pacientes com pneumonia (n=6) e as neoplasias (n=9) apresentaram o valor médio de $247,3 \times 10^6$ células/mL. Nos esfregaços destes pacientes, por vezes e ocasionalmente foram observadas células neoplásicas no LBA (Fig. 21).

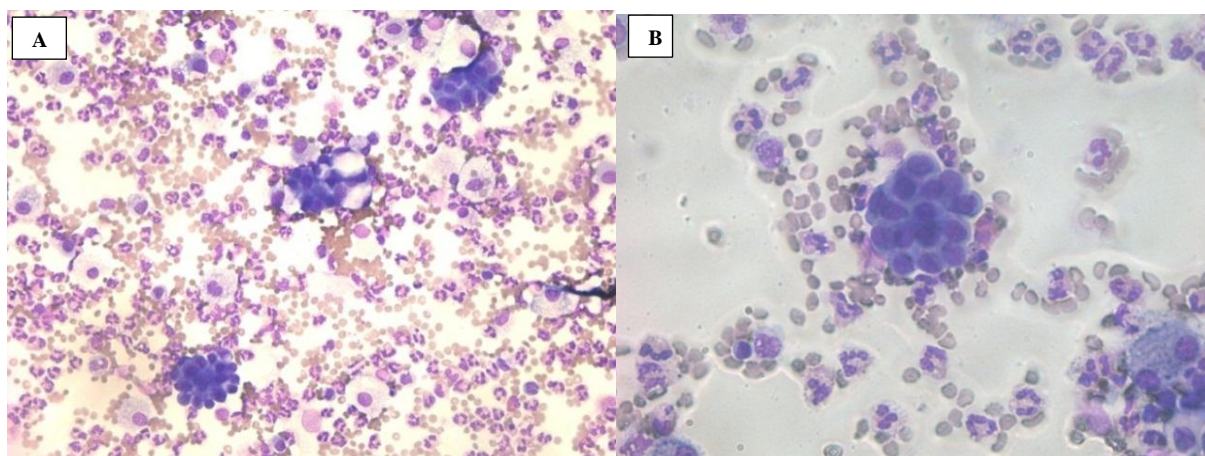


Figura 21 - Lavado broncoalveolar com presença de ninhos de células com morfologia sugestiva de células neoplásicas. Ampliação de 1000x (A) e de 400x (B). Coloração de Leishman.

As contagens das células totais foram de $362,3 \times 10^6/\text{mL}$ para o grupo com tuberculose ($n=3$), de $352,3 \times 10^6/\text{mL}$ para o grupo com alveolite ($n=4$) e de $802,3 \times 10^6/\text{mL}$ para o grupo com LES ($n=3$). Para as pneumonias, neoplasias, tuberculoses, alveolites e LES não se observaram diferenças estatisticamente significativas quando os respectivos resultados foram comparados com os controles normais. Na análise da morfologia de alguns esfregaços de DIP foram, eventualmente, observadas imagens de linfócitos com dismorfia nuclear (Fig.22)

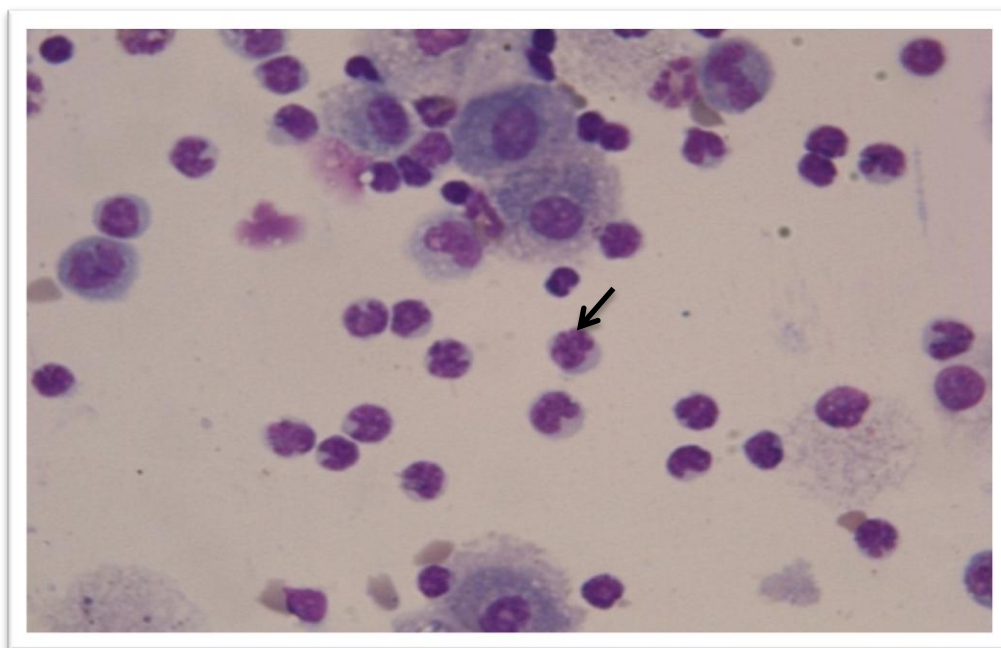


Figura 22 - Linfócitos com dismorfia do núcleo (↔) (celularidade total: $189 \times 10^6/\text{mL}$) e 50% de linfócitos. Coloração de Leishman.

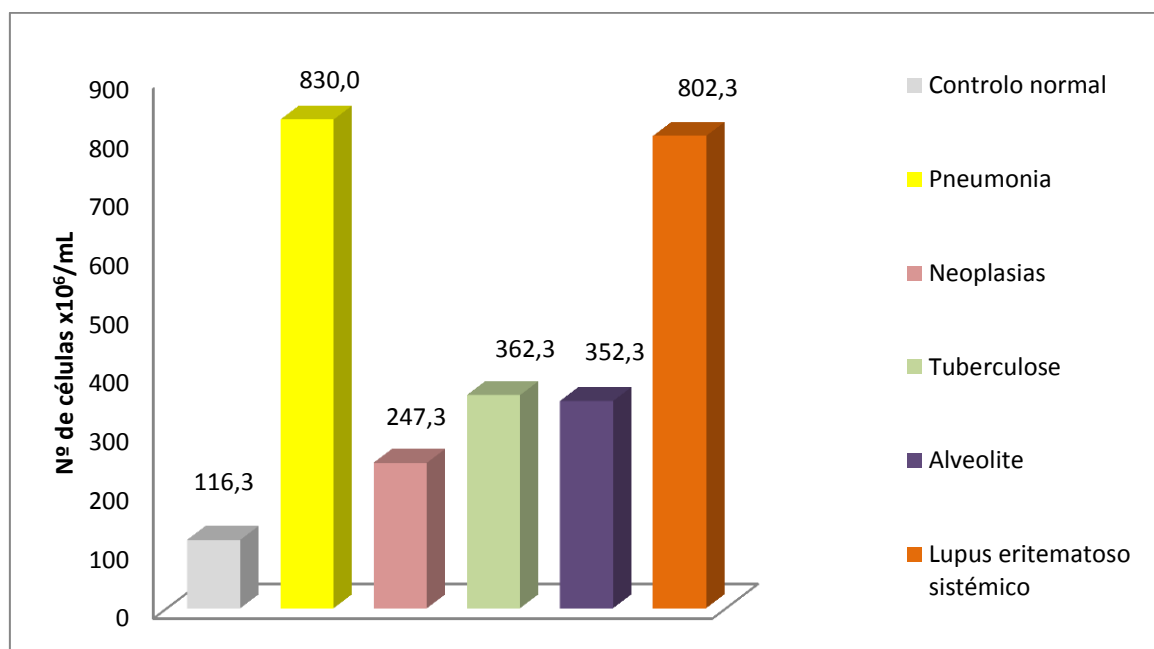


Figura 23 - Contagem de células obtidas em lavados broncoalveolares de indivíduos normais e com doenças pulmonares.

Nas patologias com número de casos estudados superior a 10 ocorreu sempre o aumento do nº de células/mL de LBA.

O grupo SS (n=39) incluiu 26 amostras de sarcoidose com diagnóstico confirmado e 13 amostras com diagnóstico aguardando a confirmação. Neste grupo, o valor médio do nº de células/mL foi de $297,4 \times 10^6/\text{mL}$ e o dos controlos normais foi de $116,3 \times 10^6/\text{mL}$. Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os pacientes e os controlos normais ($p < 0,001$).

Os doentes com PIND (n=40) apresentaram um valor médio de $343,9 \times 10^6/\text{mL}$ para a contagem celular e na FP (n=14) o valor encontrado foi de $421,5 \times 10^6/\text{mL}$. Nestas situações estudadas foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de pacientes e os controlos normais ($p < 0,001$) (Fig.24).

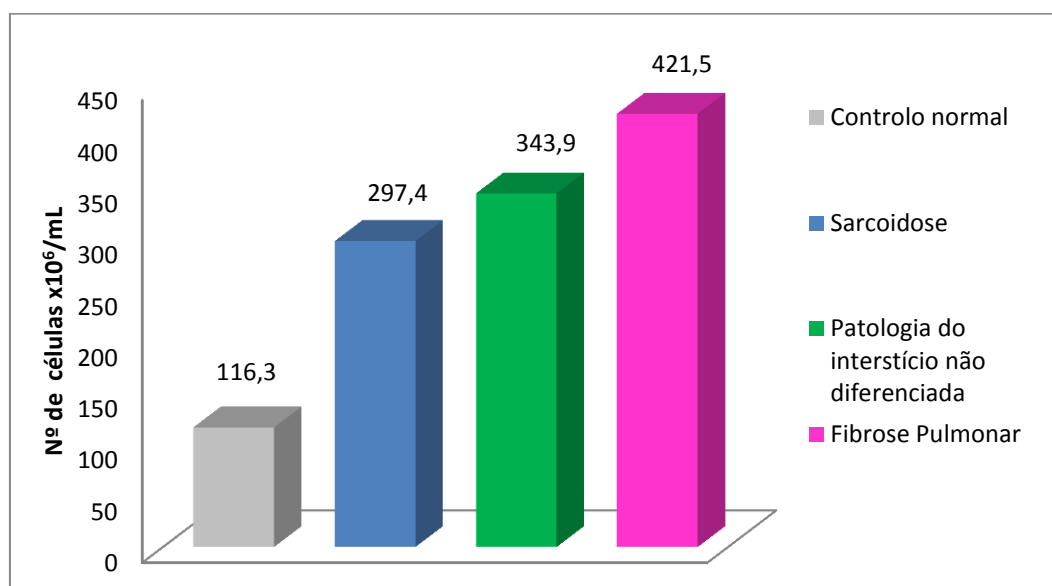


Figura 24 - Contagens celulares obtidas em lavados broncoalveolares de indivíduos normais e de doentes com patologias do interstício pulmonar.

IV.2.3. Sarcoidose

IV.2.3.1. Contagens celulares totais em lavado broncoalveolar e sangue periférico

As amostras de LBA com diagnóstico de sarcoidose (n=26) incluíram 14 homens e 12 mulheres e apresentaram o valor médio de $296,4 \times 10^6$ células/mL, superior ao valor normal encontrado pelos Autores selecionados ($\bar{x} = 116,3 \times 10^6$ /mL). Foram verificadas diferenças estatisticamente significativas entre os resultados encontrados para os pacientes e os dos controlos normais ($p=0,002$).

A totalidade das amostras de sangue periférico analisadas (n=106) revelaram um valor médio de $8,7 \times 10^6$ leucócitos/mL. As amostras de sangue dos doentes com sarcoidose (n=14) incluíram 9 indivíduos do sexo masculino e 5 do sexo feminino tendo os pacientes apresentado o valor médio igual a $7,8 \times 10^6$ leucócitos/mL, ligeiramente superior ao normal médio encontrado na literatura ($7,5 \times 10^6$ /mL). Não foram encontradas diferenças significativas entre estes valores, contrariamente ao que aconteceu no LBA. Os resultados sugerem que a utilização do LBA para estudo da sarcoidose é mais útil que as amostras sanguíneas.

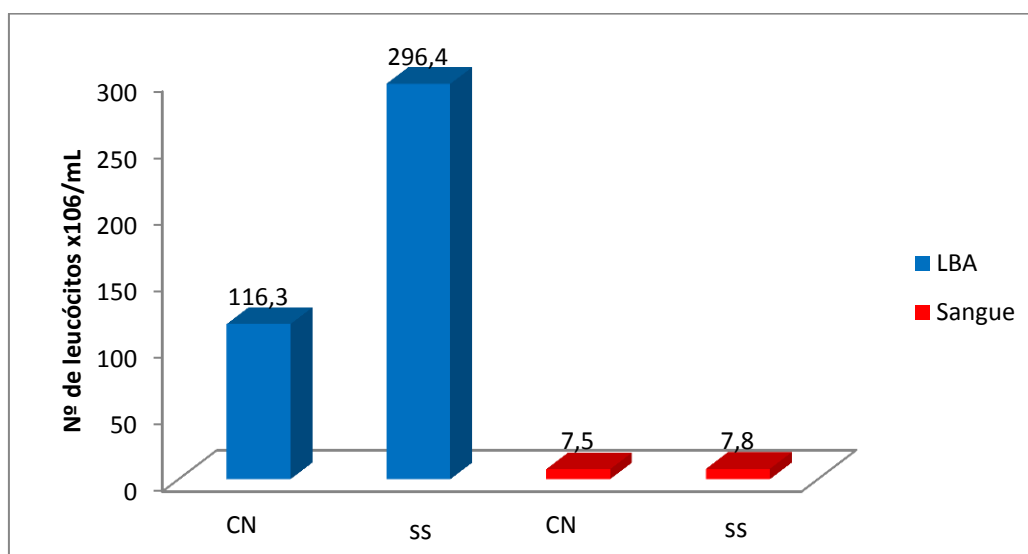


Figura 25 - Contagens celulares obtidas em lavados broncoalveolares e em sangues de controlos normais (CN) e indivíduos com sarcoidose (SS).

IV.2.3.2. Linfócitos

O grupo SS (n=39), incluiu 26 amostras de sarcoidose confirmada e 13 amostras com diagnóstico de sarcoidose aguardando confirmação, e apresentou o valor médio da % de linfócitos (20,4 %) superior ao normal (9,4%), sendo $p=0,003$ (Fig.26). Os dados analisados mostram que, nesta patologia, o nº de linfócitos no LBA se encontram frequentemente aumentados. No esfregaço destes pacientes por vezes ocorre a formação de rosetas (conjuntos de linfócitos revestindo os macrófagos) (Fig. 27).

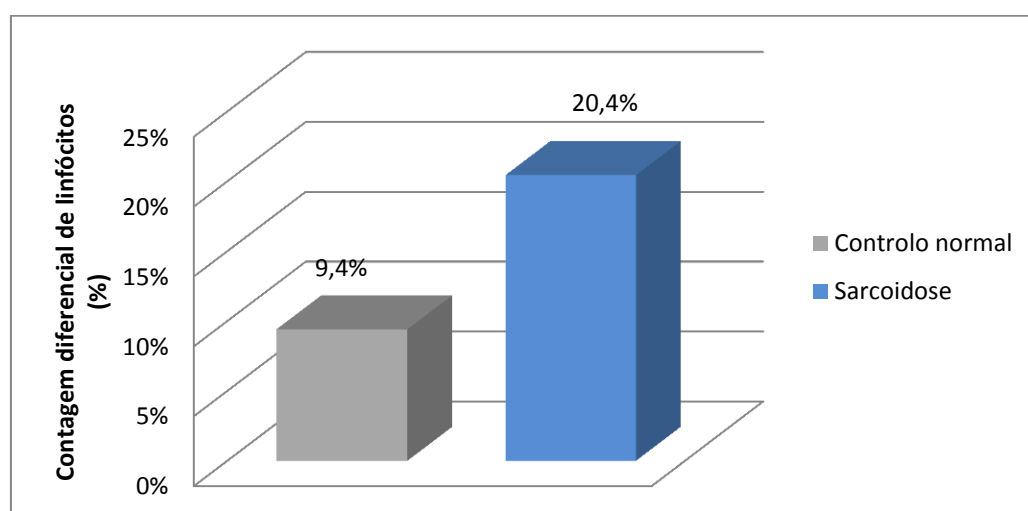


Figura 26 - Percentagem de linfócitos, obtida em lavados broncoalveolares de controlos normais e em doentes com sarcoidose.

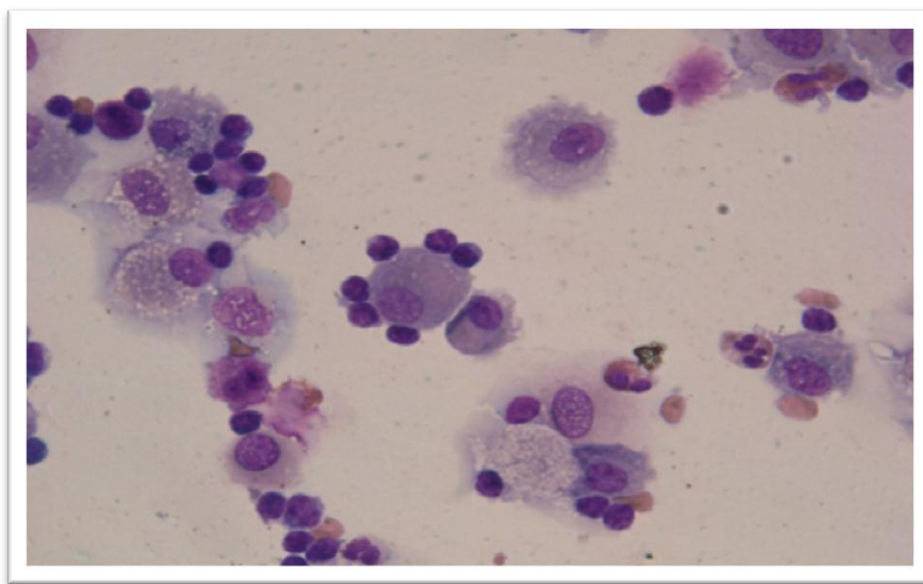


Figura 27 - Lavado broncoalveolar de indivíduo com linfocitose (81% de linfócitos) evidenciando rosetas de linfócitos/macrófagos. Coloração de Leishman. Ampliação 1000x.

IV.2.3.3. Macrófagos

O grupo SS (n= 39) apresentou o valor médio do nº de macrófagos do LBA (70,6 %) ligeiramente inferior ao do controlo normal (79%), sendo a diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) (Fig. 30).

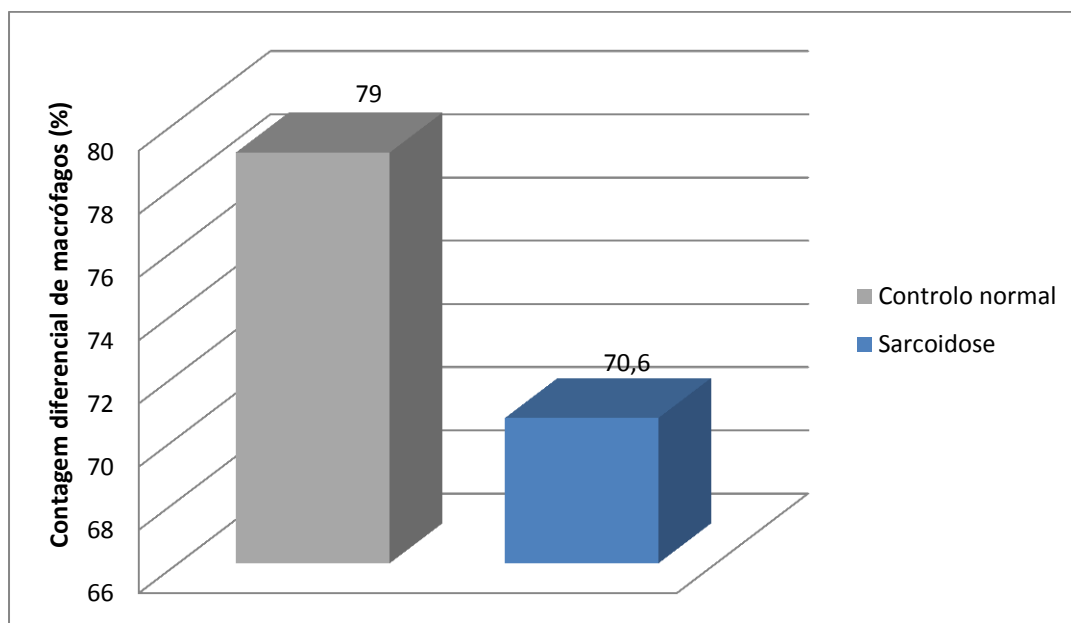


Figura 28 - Macrófagos no lavado broncoalveolar de indivíduos normais e pacientes com sarcoidose .

IV.2.3.4. Razão CD4/CD8

O grupo SS analisado incluiu 15 amostras de sarcoidose confirmada e 9 com diagnóstico de sarcoidose (aguardando confirmação) e apresentou um valor médio para a razão CD4/CD8 (6,9) superior ao normal (1,7) ($p=0,001$) (Fig.29).

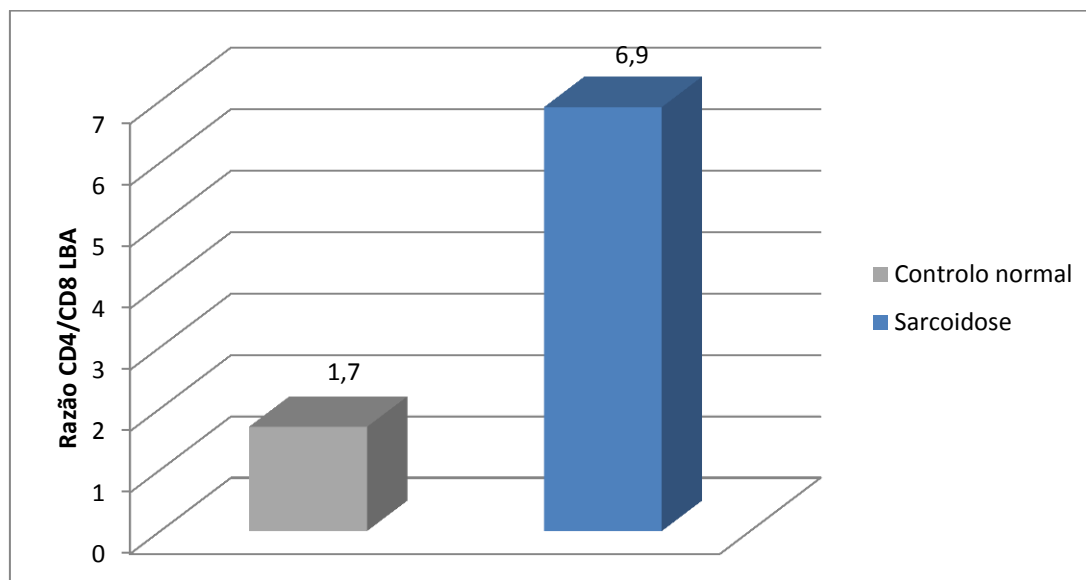


Figura 29 - Razão CD4/CD8 em lavado broncoalveolar de indivíduos normais e doentes com sarcoidose.

IV.2.4. Fibrose pulmonar

O nº de amostras com FP analisadas foi bastante reduzido ($n=3$). A razão CD4/CD8 apresentou o valor médio de 0,4 inferior ao do controlo normal (1,7) com $p=0,002$. De salientar a diferença estatisticamente significativa ($p=0,003$) que ocorreu entre os valores obtidos nestes pacientes e os encontrados nos doentes com sarcoidose (6,9), sugerindo que este parâmetro possa ser relevante para o diagnóstico diferencial destas duas situações patológicas (Fig. 30)

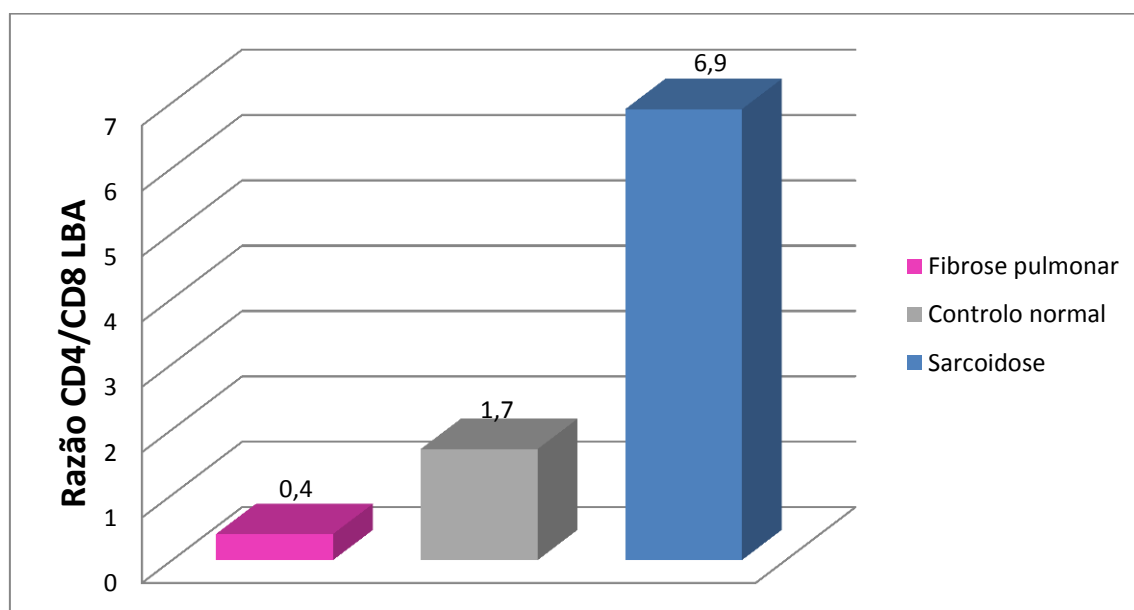


Figura 30 - Razão CD4/CD8 no lavado broncoalveolar de indivíduos com fibrose pulmonar, indivíduos normais e em doentes com sarcoidose.

V. Discussão de Resultados

Neste trabalho, pretendeu-se analisar a totalidade dos LBA que chegaram para análise ao laboratório de hematologia do Centro Hospitalar Lisboa Norte em Lisboa, para tentar apurar o interesse preditivo deste teste na evolução e prognóstico das DIP. No entanto, a maioria dos LBA não traziam informação clínica (23,7%), o que dificultou a análise global e restringiu o interesse de execução da técnica.

As patologias com maior representatividade foram as PIND (19,3%) e a sarcoidose (12,6%). O grupo sem qualquer informação clínica não foi incluído no estudo por impossibilidade de interpretação dos resultados. Alguns dos LBA incluídos no grupo “diversos casos” como a asbestose, a esclerodermia, a vasculite, a conectivite e a hipereosinofília pulmonar apresentaram um número reduzido de amostras, mas revelaram-se interessantes para prosseguir estudos mais completos.

O valor do controlo normal utilizado neste estudo foi obtido partir de resultados referenciados por diversos Autores, que realizaram o LBA em indivíduos saudáveis. À semelhança do que aconteceu com os resultados dos grupos em estudo também ocorreu uma grande variabilidade de valores entre os vários Autores referenciados. Foi realizada uma média dos dados referidos na literatura para obtenção dos CN, utilizados como termo de comparação, uma vez que os LBA disponíveis para execução deste trabalho não incluíram amostras normais, dado que este tipo de exame não é realizado em pessoas saudáveis mas, apenas, em casos em que existe uma suspeita de DIP.

Nos esfregaços de LBA observaram-se, pontualmente, células do epitélio brônquico sugerindo contaminação da amostra e dificuldade na realização da colheita, não tendo esta atingindo adequadamente as vias aéreas inferiores (96).

Após a instituição da broncofibroscopia associada ao LBA, só a partir dos anos 70 é que se começaram a realizar os primeiros estudos em seres humanos voluntários e normais. Denotamos que, entre os estudos efetuados pelos diferentes Autores, existiu grande discrepância em relação ao número de indivíduos estudados, volume instilado e valores das contagens celulares obtidas (21,30).

Os Autores que apresentaram médias mais elevadas para o nº de células do LBA reportaram valores médios entre 158 e 206x10⁶ células /mL, enquanto que os valores médios mais baixos variaram entre os 58 e as 112x10⁶ células /mL de LBA (21,30-32). Os volumes instilados variaram entre os 100 e 350 mL. A maior % de macrófagos referida como normal foi

95,1% e a menor foi 70%. Os valores das % de linfócitos encontradas variou entre de 15,7% e 3,9% (30,31,36, 39, 47- 49).

A presença de linfócitos maduros no LBA, com ausência de neutrófilos, sugere sarcoidose e a existência de linfócitos com núcleos atípicos e citoplasma abundante, em conjunto com a presença de macrófagos de aspeto espumoso, aponta para PH. O predomínio linfocitário com discreta elevação de neutrófilos encontra-se presente em várias entidades sugerindo aspetos prognósticos e evolutivos concretos. Este padrão, pode encontrar-se em sarcoidoses avançadas que apresentam lesões destrutivas, nas fases iniciais da PH e na tuberculose indicando, também, um mau prognóstico nas infeções por *P.carinii* e VIH ou em fases de transição da afetação pulmonar da artrite reumatóide.

No contexto de uma alveolite linfocitária, a existência de células plasmáticas aponta para PH ou infeção por *P.carinii*, e a presença de células neoplásicas associadas ao aumento da % de linfócitos sugere uma linfangite carcinomatosa (96).

Relativamente à % de neutrófilos, o maior valor encontrado em indivíduos normais foi de 12%. Alguns Autores não observaram neutrófilos em indivíduos normais. O aumento de neutrófilos (>3%) no LBA de doentes, recentemente diagnosticadas com sarcoidose, correlaciona-se com a deterioração clínica durante o “follow-up” e um risco significativamente mais alto da necessidade de terapia com corticoesteróides. Uma elevação exclusiva de neutrófilos sugere bronquite aguda e/ou hábitos tabágicos (11,30, 56).

Na experiência de Arellano e colaboradores (1997) o aumento acentuado de neutrófilos encontra-se predominantemente nas bronquiectasias. Excluídas estas hipóteses (pela clínica ou pela TAC), a % de neutrófilos superiores a 25% encontra-se na FP idiopática. Outras causas são as fibroses das collagenoses (artrite reumatoide, esclerodermia e doença mista do tecido conjuntivo), a asbestose e a histiocitose X. Contudo, este aumento de neutrófilos pode estar associado à colheita do LBA (95,96,104,105).

Alguns Autores não observaram eosinófilos no LBA de indivíduos saudáveis e a maior % de eosinófilos encontrada foi de 0,6% (11,21,30,32,34,35).

A alveolite eosinofílica é característica de infiltrados pulmonares com eosinofilia, na asma brônquica, aspergilose broncopulmonar alérgica, alergia a fármacos, síndrome de Churg-Strauss e FP idiopática. As percentagens mais elevadas de eosinófilos encontram-se nas PE agudas e crónicas. O estudo do tipo de eosinófilos, usando gradientes de metrizamida, ajuda a distinguir estas pneumonias da síndrome de Churg-Strauss (angeíte ou granulomatose alérgica)

em que ocorre inflamação eosinofílica e presença de granulomas, extravasculares podendo originar vasculite necrosante. A percentagem de eosinófilos superior a 3% é um índice de mau prognóstico na FP e nas fibroses associadas às colagenoses (106-109).

O predomínio de eosinófilos associado a um aumento discreto de linfócitos pode ocorrer em algumas formas de PE crónica e é indicativo de mau prognóstico, mas o predomínio de linfócitos, na presença de eosinófilos ocasionais, encontra-se referido em alguns casos de sarcoidose e na afetação pulmonar da linfadenopatia angioimunoblástica, mas o quadro clínico permite diferenciar ambas as entidades (95).

A elevação conjunta de linfócitos, neutrófilos e eosinófilos ocorre nas fases iniciais das PH, na bronquiolite obliterante com pneumonia organizativa, em algumas infeções por *P.carinii* e em doentes com VIH, sendo indicativa de mau prognóstico (95).

A história clínica dos pacientes pode pôr em evidência a existência de uma neoplasia, a utilização de fármacos pneumotóxicos, recurso a radioterapia ou exposição ocupacional (berílio, asbestos). O LBA é útil para identificar as partículas minerais e, por conseguinte, faz um diagnóstico de exposição. No entanto, com exceção da berliose, o LBA não permite o diagnóstico deste tipo de doenças ocupacionais. O achado de corpos de asbestos no LBA de um doente exposto, não significa que este doente tenha uma asbestose, mas pode ser indicativo de uma alveolite secundária (19,26,84).

Apesar da variabilidade dos resultados referidos, é aceite que a maioria das células do LBA do indivíduo normal são macrófagos (normalmente mais de 90%). Os linfócitos compreendem aproximadamente 3 a 15% das células contadas e os neutrófilos são inferiores a 3%. Outros tipos de células, tais como eosinófilos e basófilos, geralmente, representam menos de 2% (21,22,30-37).

A grande variabilidade dos valores encontrados na literatura e referentes a indivíduos normais, deve-se a vários fatores tais como tabagismo e os volumes de fluido instilado e recuperado, durante a realização da broncofibroscopia.

Uma contagem celular normal pode ajudar a excluir doenças específicas, em que podemos observar um predomínio de macrófagos alveolares. Os resultados da celularidade total obtidos no LBA apresentam uma grande dispersão, que se justifica pela heterogeneidade das doenças estudadas. Normalmente, existe uma boa concordância entre resultados de indivíduos normais mas, podem ser encontradas variações significativas nas diferentes doenças pulmonares.

O número de células recuperadas no LBA de fumadores encontra-se geralmente aumentado, tal como aconteceu neste trabalho ($345 \times 10^6/\text{mL}$). Nesta amostra houve predomínio de macrófagos alveolares e o número de macrófagos está fortemente correlacionado com o consumo diário de cigarros (53). Nestes doentes podem observar-se inclusões citoplasmáticas designadas por “inclusões do fumador” que correspondem a depósitos lipídicos pigmentados devido ao fumo do tabaco. O citoplasma dos macrófagos alveolares, pode conter todos os tipos de materiais que tenham fagocitado tais como carbono, hemossiderina, fragmentos celulares, corpos estranhos e detritos. A contagem celular do LBA do indivíduo saudável e fumador encontra-se normalmente aumentada em relação ao LBA normal. Os macrófagos alveolares são as células mais frequentemente encontradas em ambos, mas no LBA normal não apresentam inclusões. As contagens diferenciais de células do LBA mostram uma alveolite inconstante e de intensidade variável, que se traduz na presença de uma elevada percentagem de monócitos, uma ligeira neutrofilia e/ou eosinofilia (geralmente $<10\%$). A proporção de linfócitos alveolares encontra-se normal ou diminuída, com redução da razão CD4/CD8, característica dos fumadores (17,19, 46,53).

Neste trabalho não foram diferenciados fumadores e não fumadores, devido à falta dessa informação relativa aos LBA rececionados pelo laboratório. Esta escassez de informação também se fez sentir em relação aos volumes de LBA recebidos para análise. Frequentemente, foi observada uma grande discrepância nos volumes rececionados (0,5-100 mL). Apesar de não existir um consenso generalizado sobre o volume de LBA instilado e recuperado, a maioria dos Autores menciona que uma % de volume recuperado entre os 40 a 70% se correlaciona com o número total de células obtidas (8,11,22,25,30).

Quando a amostra de LBA se destinava a análise citológica e bacteriológica, era repartida pelos laboratórios de hematologia e bacteriologia. Nestes casos, o laboratório de hematologia não tinha acesso à totalidade do volume de LBA recuperado.

O volume instilado, para LBA, em todo o Centro Hospitalar Lisboa Norte, é de 150 mL, em 3 seringas de 50 mL cada. Contudo, apesar desta uniformização o volume recuperado sofre variações, dependentes da experiência do operador na realização da técnica, da boa ou má “encravação” do broncofibroscópio nos brônquios, da fácil colapsidade destes, do grau de tolerância do doente à técnica, da indução de tosse pelo paciente, da deterioração funcional e do tipo de patologia subjacente que condicionam a % de LBA recuperado. Esta variabilidade é, também, afetada pela evolução clínica dos pacientes, a falta de homogeneidade de afetação dos

diferentes territórios pulmonares e a variabilidade no grau de repercussão funcional. Nas doenças pulmonares vários fatores podem influenciar a recuperação do LBA e podem levar a dificuldade na recuperação do fluido instilado, que ocorre principalmente nas doenças obstrutivas (7,110).

Vários estudos avaliaram a variação interlobar dos perfis celulares recuperados e observaram uma boa correlação existente entre as contagens diferenciais provenientes de diferentes locais interlobares (amostras do lobo médio *versus* amostras da língua) em pacientes com sarcoidose pulmonar mas, menos boa, em pacientes com FP ou doença mista do tecido conectivo (7,108). Schildge e colaboradores (2007) verificaram que, em patologias obstrutivas como a POC, idade avançada, hábitos tabágicos e um baixo volume expiratório forçado/capacidade vital forçada, a taxa de recuperação era mais baixa, mas citam que a quantidade de LBA (mesmo em volumes de 30%) é independente e não afeta a recuperação dos componentes celulares e não celulares do LBA (111).

Nos doentes estudados a um maior volume recuperado (81-100 mL) correspondeu, também, um maior nº de células ($781 \times 10^6/\text{mL}$). Morales e colaboradores (2009) elaboraram um estudo com o objetivo de identificar os fatores que influenciam a celularidade do LBA em indivíduos com DIP. Para isso, correlacionaram o LBA recuperado com as alterações endobrônquicas, tais como a atrofia severa, edema, enrijecimento, secreções abundantes e presença de surfactante. Concluíram que as alterações endobrônquicas não influenciam a celularidade do LBA e observaram uma maior recuperação celular em pacientes com secreções no trato respiratório. Referiram também que um maior volume de LBA recuperado correspondia a uma maior celularidade total, influenciada por uma encravação adequada do broncofibroscópio, havendo tendência para recuperar menos células em doentes com atrofia severa da mucosa (112).

As diferentes DIP analisadas, apresentaram um valor médio do nº de células do LBA, superior ao normal ($116,3 \times 10^6/\text{mL}$). Nos esfregaços de alguns destes doentes, foram observados linfócitos com dismorfia do núcleo. Taniuchi e colaboradores (2009) afirmam que estes achados são compatíveis com PH, descrevendo a presença de linfócitos ativados e com irregularidades nos contornos das membranas nucleares, comparativamente aos linfócitos encontrados na sarcoidose que são caracterizados por terem tamanho pequeno e morfologia normal. A linfocitose acentuada, é compatível com PH (115).

As amostras de pneumonia (n=6) apresentaram o valor médio do nº de células de $830,0 \times 10^6/\text{mL}$, e as de neoplasias (n=9) $247,2 \times 10^6/\text{mL}$. O LBA é uma ferramenta útil para o diagnóstico de neoplasias difusas ou disseminadas do pulmão, que não envolvem as estruturas brônquicas visíveis por endoscopia. O adenocarcinoma ou tumores com padrões de crescimento linfangíticos são mais facilmente diagnosticado pelo LBA e, nestes casos, o rendimento diagnóstico relatado é superior a 80% (86).

A tuberculose (n=3) apresentou o valor médio de $362,33 \times 10^6$ células/mL, as amostras de alveolite (n=4) $352,25 \times 10^6$ células/mL, e as de LES (n=3) $802,3 \times 10^6$ células/mL. Em relação à pneumonia, neoplasias, tuberculose, alveolite e LES não se observaram diferenças estatisticamente significativas relativamente aos controlos normais devido ao facto de, em todas elas, o número ser muito pequeno (n<10).

Todos os grupos de patologias estudados apresentaram valores do nº de células/mL de LBA superior ao descrito na literatura ($116,3 \times 10^6/\text{mL}$) para amostras normais. Os resultados mais elevados ocorreram na pneumonia ($830,00 \times 10^6/\text{mL}$) e no LES ($802,33 \times 10^6/\text{mL}$).

As contagens celulares absolutas no LBA são influenciadas pela presença de doença e pelos hábitos tabágicos. Taskinen e colaboradores (1994) afirmaram que uma contagem normal total de células em LBA pode ser observada na alveolite fibrosante após tratamento prolongado, em vários processos fibróticos, em citomegalovírus nos pacientes imunocomprometidos e na sarcoidose tratada ou de baixa atividade. Na pneumonias ocorreu uma celularidade elevada ($830 \times 10^6/\text{mL}$) o que está de acordo com o Autor que descreve que concentrações celulares mais elevadas ($> 800 \times 10^6 /\text{mL}$) podem ser observadas nas infeções, pneumonias eosinofílicas, bacterianas e nas leucemias (115).

Alguns Autores observaram neutrofília no LBA de doentes com pneumonia (de origem bacteriana, por *P.jiroveci* em doentes com HIV, por *C. pneumoniae* e pneumonias associadas a ventilação mecânica) mas nenhum relatou o nº médio de células totais do LBA dando apenas ênfase ao aumento de neutrófilos, como bom indicador inflamatório no caso das pneumonias de origem bacteriana, em doentes infetados com *P.jiroveci* com maior compromisso respiratório, e como bom indicador prognóstico em doentes de alto risco que necessitem de ventilação mecânica (116,117).

Nas pneumonias adquiridas na comunidade o LBA assume interesse diagnóstico em quadros clínicos graves ou em insucessos terapêuticos (13). Doentes com pneumonia em conjunto com VIH, imunodeficiências primárias, imunossupressão, pneumonias nosocomiais

graves ou sem resposta aos antimicrobianos, tem indicação para realização de exames mais invasivos que apresentem possibilidade de diagnóstico etiológico, como o LBA e BP, tendo estes sensibilidade e especificidade elevadas. Nas pneumonias associadas à ventilação o LBA tem-se demonstrado com pouco valor diagnóstico, mas um bom indicador prognóstico para identificar pacientes de elevado risco que necessitem de ventilação mecânica (13,118,119).

A PE é uma doença rara sendo caracterizada por uma apresentação clínica subaguda ou crônica, com eosinofilia periférica e no LBA. Vários Autores observaram eosinofilia na grande maioria dos pacientes sendo este parâmetro muito sugestivo de PE crônica. Apenas Bento e colaboradores (2010) descreveram dois casos de PE crônica em que mencionaram, para além da contagem diferencial, uma contagem celular total de $460 \times 10^6/\text{mL}$. O grupo LES também apresentou uma celularidade elevada ($802,33 \times 10^6/\text{mL}$). Uma vez que a inflamação alveolar é uma característica de pacientes com doença do colagénio, com e sem DIP associada, a citologia do LBA não é considerada válida para o diagnóstico da DIP, neste contexto (120). O tipo de alveolite varia segundo a doença do colagénio implícita. Na artrite reumatóide, no LES e na síndrome de Sjögren primária pode haver uma alveolite latente e linfocítica T com predomínio de linfócitos CD4+, que se converte em neutrofílica quando há doença pulmonar clinicamente evidente. A presença de linfócitos T é um achado frequente em doentes com LES e com envolvimento pulmonar (5,120,121-123). Nestes pacientes o LBA pode ser útil para o estudo da toxicidade induzida por fármacos ou para o diagnóstico de complicações infecciosas. Nenhum Autor refere a celularidade total no LBA no LES, dando apenas ênfase ao aumento diferencial de linfócitos T ativados, apresentando uma tendência, também, para a neutrofília.

No LBA de indivíduos com sarcoidose confirmada ($n=26$) ocorreu um valor médio do nº de células ($296,4 \times 10^6/\text{mL}$) superior ao normal ($116,3 \times 10^6/\text{mL}$), e as amostras de sangue ($n=14$) apresentaram uma contagem de $7,8 \times 10^6/\text{mL}$, valor próximo do normal ($7,5 \times 10^6/\text{mL}$). Tal constatação sugere que o estudo do LBA, em pacientes com sarcoidose é mais interessante que a contagem celular sanguínea.

O aumento do nº de células no LBA de doentes com sarcoidose reflete pneumonite intersticial subjacente, com predomínio de células T, análoga ao processo inflamatório precoce, encontrado em todos os órgãos afetados pela doença (113).

A *American Thoracic Society* descreveu em 1999 que a variação do nº de leucócitos encontrados no sangue dos doentes com sarcoidose é frequente observando-se uma leucopenia, que raramente é severa em apenas de 40% dos casos. Na ausência de esplenomegalia, o

mecanismo mais comum é a redistribuição das células T sanguíneas nos locais de doença ativa, tais como o pulmão (114).

Na determinação da % de linfócitos do grupo SS foram incluídos doentes com sarcoidose confirmada e doentes com diagnóstico de sarcoidose, aguardando confirmação, que foram comparados com o valor de referência (9,4%). O grupo SS (n=39) apresentou o valor médio de linfócitos de 20,4 %, superior ao normal (9,4%). Nos pacientes com sarcoidose foram observadas rosetas tendo estas sido descritas em doentes com sarcoidose ativa (8,23). Estes linfócitos aderem e não caem, e não são fagocitados pelos macrófagos alveolares. Lyons e colaboradores (1992) descreveram este fenómeno designado por “peripolese” como um provável mecanismo fisiológico envolvido na regulação da RI no pulmão. O fenómeno foi também observado em carcinoma bronquiolar, tuberculose, asma e em pacientes sem doença pulmonar detetável. Em todos os casos encontraram um número elevado de linfócitos na lavagem (124). Bauer e colaboradores (2000) concluíram que estes agregados não eram específicos de doença granulomatosa, mas que estariam fortemente associados com um aumento de linfócitos no LBA (125).

Maarddeveen e colaboradores (1993) observaram, no LBA doentes com sarcoidose ativa, a presença de um infiltrado de células mononucleares, contendo agregados de linfócitos aderidos à superfície de macrófagos. A fim de investigar que tipos de interações celulares estariam envolvidos em tal processo, cultivaram as suspensões de células obtidas a partir do LBA de pacientes com sarcoidose ativa e AAE durante 1-2 dias. A peripolese, observada no LBA, pode durar de alguns minutos ou algumas horas. Nesse tempo um certo número de linfócitos movimentou-se em volta de um único macrófago alveolar, sem perder o contacto com este. Interações de curtos períodos eram, principalmente observadas em AAE enquanto que na sarcoidose ocorreram longos períodos de ligação entre linfócitos e macrófagos (126). Reynolds e colaboradores (2000) colocaram a hipótese destas rosetas se formarem devido à apresentação ativa do Ag no foco de inflamação (29).

Mais recentemente Danila e colaboradores (2009) observaram estas rosetas, com maior frequência, no LBA de pacientes com sarcoidose sintomáticos, afirmando que estas células seriam o reflexo de granulomas resultantes de reação inflamatória no parênquima pulmonar. As rosetas são formadas por macrófagos e linfócitos T que são os componentes do granuloma de origem imunitária. Os macrófagos alveolares e os linfócitos T dos doentes com sarcoidose estão

ativados e libertam diversos mediadores que recrutam outras células do sistema imunológico para o parênquima pulmonar (39).

Quando se usam contagens celulares diferenciais para a identificação de DIP não existe nenhum parâmetro que, isolado, seja relevante mas, a combinação de vários dados (elevação média ou normal da contagem celular total, predomínio de linfócitos, % de neutrófilos e eosinófilos normal ou diminuída e ausência de plasmócitos e macrófagos alveolares vacuolizados) são indicativos de sarcoidose. Pelo menos 90% dos doentes com esta patologia exibem uma linfocitose no LBA que se pensa estar relacionada com a atividade inflamatória da doença.

Na sarcoidose, os achados clínicos relacionados com o envolvimento de órgãos específicos, variam com muita frequência. Existem dois tipos de acometimento na sarcoidose: aguda (podendo apresentar-se como síndrome de Löfgren de início insidioso) e crónica. O perfil do LBA também pode variar com a apresentação clínica de sarcoidose. A proporção relativa de linfócitos está de certa forma aumentada na doença clinicamente ativa (em média 40%), mas na sarcoidose clinicamente inativa os doentes apresentam uma % inferior (em média 30%) evidenciando-se uma considerável discrepância de linfócitos entre a doença ativa e inativa. Esta proporção também pode encontrar-se dentro dos valores normais em 10 a 15% dos doentes. As características mais frequentemente encontradas nos doentes com síndrome de Löfgren (N=22) foram uma alveolite com linfocitose e a razão CD4/CD8 elevadas, sugerindo uma RI sistémica em vez de local. Para além disso a alveolite era menos pronunciada nos fumadores (56,68). A apresentação da doença, no momento em que o LBA é realizado, é fundamental para a interpretação de cada um dos resultados mas, para este trabalho, não obtivemos acesso a essa informação

O valor prognóstico da linfocitose no LBA e o seu valor como indicador para a terapia com corticosteróides mostraram-se questionáveis. Muitos estudos demonstraram que o grau de linfocitose na altura do diagnóstico não tem valor prognóstico (50,127,128). Por outro lado, pacientes com um bom prognóstico e alta probabilidade de remissão espontânea como alguns casos de sarcoidose aguda podem apresentar valores da razão CD4/CD8 elevados (56,129). Plancke e colaboradores (2001) demonstraram que um aumento da razão CD4/CD8 no LBA esteve associado a um prognóstico favorável num paciente com síndrome de Löfgren (130). Dois grupos independentes revelaram que o aumento de neutrófilos (>3%) no LBA, de doentes

recentemente diagnosticadas com sarcoidose, correlacionavam-se com a deterioração clínica e o aumento da necessidade de administração de corticoesteróides (131,132).

Muitos doentes com sarcoidose extrapulmonar apresentam uma discrepância entre as anomalias encontradas no RX do tórax e a presença de alveolite. Esta, reflete a expressão local de uma RI disseminada. Também em casos de manifestações extratorácicas, como a sarcoidose ocular ou o eritema nodoso, características de alveolite com suspeita de sarcoidose, podem ser encontradas. Em casos de uveíte de causa desconhecida, o LBA pode ser suficiente para permitir um diagnóstico sem confirmação por biópsia (131,132).

Uma linfocitose no LBA não é específica e é observada em muitas outras doenças, como as granulomatosas extratorácicas da doença de Crohn e a cirrose biliar primária. Estas alterações tardias podem evidenciar uma linfocitose subclínica semelhante à da sarcoidose. O LBA é útil como complemento diagnóstico mesmo em casos de envolvimento extrapulmonar, mas tem um valor clínico limitado no seguimento de pacientes com sarcoidose (42). O aumento de linfócitos observado neste estudo apoia o diagnóstico de sarcoidose embora esta linfocitose se possa encontrar em outras doenças granulomatosas como a PH, a berlíose, a PA, a pneumoconiose, as colagenoses, a doença de Crohn, a tuberculose e a pneumonia de origem viral (42,56).

No estudo do LBA, a contagem celular diferencial, associada ao estudo imunofenotípico, nos casos em que exista um aumento de linfócitos, poderão ser importantes elementos de diagnóstico (89). As normas desenvolvidas pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* para laboratórios que realizam imunofenotipagem de linfócitos em sangue periférico, permitiram que se adquirisse um maior grau de padronização das técnicas de CF para a determinação de subpopulações linfocitárias específicas especialmente as células CD4+. Essas diretrizes proporcionaram recomendações para a colheita e transporte de amostras, processamento e definição de painéis de Acs monoclonais a utilizar, uso de controles, processamento de controlo de qualidade do citómetro, análise e armazenamento de dados. Contudo, ainda não foram estabelecidas diretrizes para imunofenotipagem de linfócitos em líquidos biológicos tais como o LBA (103).

A ausência de uniformidade torna a comparação dos dados da imunofenotipagem de linfócitos, entre as várias publicações existentes, difícil. Os dados podem ser obtidos rapidamente por CF mas muitas vezes, a heterogeneidade das populações celulares torna a análise difícil e pode levar à exclusão de células de interesse, bem como à inclusão de células

indesejadas. A sobreposição de grupos de células e de resíduos são difíceis de interpretar. A autofluorescência celular e as ligações não específicas, que podem ser fortes podem gerar resultados imprecisos. A técnica de obtenção do LBA, pode muitas vezes, levar à morte celular. A viabilidade das células recuperadas, geralmente, é superior a 80% mas, raramente, ultrapassa os 90% (26).

As amostras de LBA são frequentemente contaminadas com eritrócitos, o que pode representar alguns problemas específicos na análise por CF, uma vez que estes dispersam a luz de forma semelhante aos linfócitos, podendo levar a uma subestimação da sua percentagem real. A solução lise é utilizada para remover eritrócitos. No entanto, qualquer substância lisante pode levar à libertação de restos celulares e interferir com a pureza da população linfocitária prejudicando a qualidade dos resultados da CF.

Os linfócitos formam populações homogêneas de pequenas células que expressam altos níveis de CD45. Os macrófagos totais do LBA raramente têm significado clínico mas a neutrofilia e a eosinofilia são parâmetros de diagnóstico importantes (103). A definição de janela de análise torna-se mais fácil quando há um aumento da percentagem (> 10%) de linfócitos no LBA.

O uso de três cores e uma janela de células CD45+ e SS para o estudo de sangue total é o método mais comum para a análise de linfócitos no LBA.

Neste trabalho, os linfócitos foram identificados pela sua dispersão lateral (SS) e pela expressão de CD45, com os subconjuntos de células T identificados por CD4+, CD8+ CD19+ e CD56+. A combinação de CD3+, CD4+ e CD8+ garante que esses marcadores são medidos apenas em células T. Embora os métodos padrão, usados na análise de fenótipos celulares de linfócitos, em sangue periférico e por CF, não sejam facilmente aplicáveis na análise de LBA, devido à heterogeneidade das células e à presença de partículas estranhas (asbestos, partículas de sílica, etc.) o desenvolvimento de um procedimento padronizado para a imunofenotipagem de linfócitos do LBA, irá permitir fazer, mais facilmente, comparações entre os diversos estudos publicados (97,103).

O grupo SS apresentou um valor médio de macrófagos (70,6 %) inferior ao normal (79%). Um aumento de macrófagos é frequentemente, encontrado em LBA com celularidade normal. Apesar dos macrófagos alveolares e outras células das vias respiratórias não terem provado ser úteis para detetar sarcoidose ou monitorizar a sua terapêutica, contribuem para uma melhor compreensão da RI tendo vários estudos mostrado uma boa correlação entre o tipo e o

número de células inflamatórias obtidas no LBA e as observadas em cortes histológicos de biópsias (54,145,146).

A razão CD4/CD8, no grupo SS, apresentou um valor médio (6,9) superior ao normal (1,7). As 15 amostras de sarcoidose confirmada apresentaram uma razão CD4/CD8 média de 4,8 enquanto que a sarcoidose não confirmada (n=9) apresentou uma razão média de 10,4. A razão CD4/CD8 mais elevada foi encontrada nos doentes com SS (6,9).

A sarcoidose é caracterizada por um aumento do número absoluto e relativo dos linfócitos e por um aumento da relação CD4/CD8 no LBA. Quando a relação CD4/CD8 é combinada com a % de linfócitos a probabilidade do diagnóstico ser sarcoidose pode exceder os 85%. No entanto, nem o número de linfócitos nem a relação CD4/CD8, do LBA, são específicos de qualquer doença pulmonar (24,38,127,132,133).

Winterbauer e colaboradores (1993) descobriram que os doentes com sarcoidose tinham elevadas razões CD4/CD8, poucos neutrófilos e 1% ou menos de eosinófilos. O nº de linfócitos e a razão CD4/CD8 não são características específicas de nenhuma doença pulmonar, e o seu valor diagnóstico tem sido debatido devido à sua alta variabilidade na sarcoidose (134). A razão CD4/CD8 está aumentada em aproximadamente em 50 a 60% dos doentes com sarcoidose, mas e também pode até estar diminuída em alguns pacientes (15%) (63).

Todavia, vários grupos independentes encontraram valores quase idênticos para a sensibilidade e especificidade desta razão. Valores acima de 3,5 têm uma sensibilidade de 52 a 59% e uma especificidade de 94-96% e, segundo Danilla e colaboradores (2009), uma razão CD4/CD8 inferior a 1,0, exclui virtualmente o diagnóstico de sarcoidose (39,56,135).

Segundo Costabel (1997) o LBA pode ter valor diagnóstico na sarcoidose, se houver clínica sugestiva e aspetos radiológicos compatíveis. Uma elevação da razão CD4/CD8 pode confirmar o diagnóstico, não havendo necessidade de recorrer a biópsia em 40-60% dos pacientes. Por outro lado, sabe-se que as relações CD4/CD8 aumentadas também podem ser encontradas na berlíose, na mesma proporção que na sarcoidose, em 33% das asbestose, em 11% da tuberculoses, em 4% das FP idiopáticas e em 2% das alveolites alérgicas extrínsecas (56,136).

Welker e colaboradores (2004) mostraram que, mesmo em casos com % baixas de linfócitos, uma razão elevada de CD4/CD8 aumenta a probabilidade diagnóstica de sarcoidose em mais de 85% dos casos (127). Segundo Baughman (2001) a razão CD4/CD8 está aumentada

em aproximadamente em 50 a 60% dos doentes com sarcoidose mas também pode até estar diminuída em 15% dos pacientes (137).

A apoiar esta variabilidade, num estudo realizado por Drent e colaboradores (1997), foram identificados casos de doentes com sarcoidose (18%) identificados com uma razão CD4/CD8 abaixo de 2,0 enquanto que, numa população de pacientes com AAE em 12% dos casos observou-se uma relação acima de 3,5 (138). Também, Kantrow e colaboradores (1997) relataram que esta relação, na sarcoidose é muito variável (139).

Danilla e colaboradores (2009) descreveram que a razão CD4/CD8 é variável porque está dependente da fase radiológica, dos sintomas clínicos e do tratamento empírico anterior com corticoesteróides. Os Autores elaboraram um estudo em que avaliaram o LBA de doentes com sarcoidose, incluindo-os em 3 grupos distintos, sarcoidose sem sintomas clínicos, indivíduos normais, sarcoidose com sintomas clínicos não tratados, e sarcoidose tratada com corticoesteróides. Encontram um aumento do número de linfócitos e uma proporção aumentada de células T CD4/CD8 no LBA de doentes sintomáticos comparativamente com os indivíduos saudáveis e doentes com sarcoidose sem sintomas. O número de linfócitos no LBA de pacientes previamente tratados com corticosteróides foi menor em comparação com pacientes não tratados (140,141).

O aumento da razão CD4/CD8 que ocorreu nos doentes com sarcoidose não confirmada (10,4) foi superior ao da sarcoidose confirmada (4,8). Pode tal diferença dever-se aos estados de atividade da doença, o que está de acordo com o referido Danilla e colaboradores (2009) (140). Nos pacientes com sarcoidose confirmada estão presentes doentes já diagnosticados, provavelmente já tratados com corticoesteróides, pelo que evidenciam valores da razão CD4/CD8 inferiores aos doentes com uma suspeita de sarcoidose e com sintomas compatíveis, que não estão ainda a ser acompanhados com um tratamento adequado.

A FP (n=3) apresentou o valor médio da razão CD4/CD8 de 0,4, sendo inferior ao normal (1,7). Apesar do diagnóstico definitivo de FP ser estabelecido com recurso à biópsia, o LBA também tem sido utilizado para a investigação da sua patogenia. Em pacientes com FP, a alveolite que a caracteriza é similar à de muitas outras doenças que cursam com fibrose, apresentando número aumentado de macrófagos alveolares e de leucócitos polimorfonucleares. O seu aspeto mais característico consiste no aumento da percentagem de neutrófilos, de eosinófilos e de uma ligeira elevação de linfócitos T que, em geral, não ultrapassam os 15-20%. Segundo critérios recentes de classificação, o diagnóstico da FP pode ser realizado pela TCAR

sem necessidade de realização de BP ou recurso ao LBA (43). No entanto, em pacientes já diagnosticados, com recurso ao programa de recomendações da ATS/ERS de 2002, os achados de linfócitos no LBA ($> 30\%$) forneceram pistas para se prosseguir com o diagnóstico ajudando a prevenir diagnósticos incorretos (43).

Papiris e colaboradores (2007) demonstraram que as subpopulações de linfócitos T recuperadas no LBA estavam intimamente correlacionadas com os valores de CD4, CD8 e CD4/CD8 encontrados em BP (142). O papel dos linfócitos na patogénese da FP tem sido pouco estudado, uma vez que eles não são observados com frequência em amostras de LBA. Os linfócitos T CD8⁺ estão aumentados no LBA de doentes com FP, estando associados a um pior prognóstico. Um recrutamento excessivo de células CD8⁺ pode ocorrer em resposta a infeções virais repetidas e, esta resposta excessiva, pode desempenhar um papel no desenvolvimento de lesão pulmonar através de vários mecanismos (fator nuclear κB , $TNF\alpha$), de células epiteliais ativadas e da produção de quimiocinas pelas células alveolares que, por sua vez, amplificam as respostas inflamatórias no pulmão. Além disso, os linfócitos T CD8⁺ expressam níveis elevados de CD38, uma molécula envolvida no recrutamento de células inflamatórias e na produção de citocinas (142-144).

No grupo FP encontramos uma razão CD4/CD8 inferior ao valor normal (0,4) o que está de acordo com os achados do Pappiris (2007) (1,5) no LBA em doentes com FP (143).

VI. Conclusões e Perspetivas Futuras

A análise do LBA começou por ser desenvolvida como técnica de investigação mas, atualmente, constitui um meio de diagnóstico do pulmão infeccioso e não infeccioso. Para melhor interpretação deverão compreender-se os seus aspetos técnicos e limitações. Para que a informação recolhida pelo LBA seja útil é mandatório que existam critérios credíveis de diagnóstico.

Deverá dar-se maior relevo à morfologia das células recuperadas no LBA, que deve ser completada com os dados da contagem celular e da imunofenotipagem, para uma interpretação da informação clínica mais adequada.

A análise do LBA permite definir relações entre alguns perfis de celularidade e determinadas patologias, nomeadamente as DIP, sendo útil para a diferenciação de situações com quadros clínicos semelhantes.

Existem fatores que influenciam os resultados da análise do LBA, tais como a colheita e o transporte. A execução da colheita depende da experiência do operador na realização da técnica, da boa ou má “encravação” do broncofibroscópio, da possibilidade de colapso dos brônquios, do grau de tolerância do doente à técnica, da indução de tosse pelo paciente, da deterioração funcional e do tipo de patologia subjacente, fatores que condicionam o volume de LBA recuperado. Esta variabilidade é, também, afetada pela distinta evolução clínica entre pacientes, a falta de homogeneidade de afetação dos diferentes territórios pulmonares e a variabilidade no grau de repercussão funcional (7,110).

A quantidade e qualidade das amostras de LBA enviadas ao laboratório são elementos importantes. Volumes inferiores a 30% do volume instilado não são representativos e não se correlacionam bem com o nº de células obtidas. As amostras que contenham menos de 20×10^6 células/mL, a existência de um número excessivo de células epiteliais ($> 5\%$) com alterações morfológicas degenerativas, os artefactos que dificultem a identificação celular, a presença de exsudado leucocitário mucopurulento e o excesso de eritrócitos devido a trauma resultante da broncoscopia, não são adequados. O volume de LBA recuperado é um fator que influencia a contagem celular uma vez que, a um maior volume corresponde a uma maior recuperação celular e, conseqüentemente, uma melhor tradução dos fenómenos existentes no pulmão (16,95).

A presença de células do epitélio brônquico, no LBA, mostra que a amostra está contaminada, sugerindo que a colheita foi realizada com dificuldade e que não atingiu adequadamente as vias aéreas inferiores. O sangue pode estar presente no LBA devido a trauma

causado durante a broncofibroscopia, mas não invalida a utilização da amostra. Os LBA colhidos devem ser transportados e mantidos em gelo (no máximo até 3 horas) até ao seu processamento, para que não ocorra perda de viabilidade das células nele presentes. A gaze de algodão é útil no processamento de amostras de LBA, para retenção de muco ou de outro tipo de material, evitando a sua mistura com o sedimento obtido após centrifugação. A utilização de material de plástico, que evita a adsorção de células à sua superfície, também é recomendável (16,95).

Globalmente, as contagens celulares dos LBA apresentaram valores elevados, para as DIP analisadas, com principal destaque para a pneumonia e para o LES, que evidenciaram as celularidades mais aumentadas, entre as amostras estudadas. A determinação da celularidade total permite identificar LBA com celularidade normal ou elevada. Apesar de alguns achados morfológicos serem característicos de certas doenças, as contagens celulares (diferencial e total) não identificam doenças específicas, devendo sempre ser complementadas com os dados da CF.

Os doentes com sarcoidose apresentaram um valor médio da contagem celular aumentado, estando esta elevação relacionada com pneumonite intersticial subjacente, com predomínio de células T, correspondente ao processo inflamatório precoce, encontrado nos órgãos afetados dos doentes com esta patologia (113).

A % de linfócitos do LBA de indivíduos com sarcoidose esteve aumentada e a % de macrófagos apresentou valores diminuídos. Nestes doentes a média da razão CD4/CD8 também foi elevada, quando comparada com o valor de referência. Este aumento, deve-se à infiltração de linfócitos T CD4+ no pulmão, que representa a principal característica imunológica da doença (51,54,56,140).

Os pacientes com sarcoidose confirmada apresentaram uma razão de CD4/CD8 de 4,8 e os doentes com diagnóstico aguardando confirmação ainda apresentaram uma razão superior (10,4) sugerindo que o valor deste quociente depende da fase de atividade da doença (39).

Os pacientes com sarcoidose constituíram o grupo estudado que apresentou valores de CD4/CD8 mais elevados. Este dado, associado a um aumento de % de linfócitos no LBA, parece ser uma ferramenta útil para apoiar o diagnóstico desta situação patológica.

A diminuição da razão CD4/CD8, que ocorreu em pacientes com FP deve-se ao aumento dos linfócitos T CD8+, que estão envolvidos na patogénese desta doença e associados a um pior prognóstico. Um recrutamento excessivo de células CD8+ amplifica as respostas inflamatórias no pulmão (141,142).

As rosetas formadas por linfócitos aderentes em redor de macrófagos alveolares, que surgiram no LBA de doentes com DIP designam-se por “peripolese” e são formadas por macrófagos e linfócitos T ativados, que fazem parte do granuloma e refletem a inflamação do parênquima pulmonar (124-126).

O LBA é um procedimento que nos permite recuperar componentes celulares e não-celulares da superfície epitelial dos bronquíolos e alvéolos, uma vez que o conteúdo da superfície epitelial do alvéolo é representativo do mecanismo inflamatório e imunitário de todo o trato respiratório inferior, sendo útil para o diagnóstico de doenças infecciosas, inflamatórias e neoplásicas. Contudo, a sua principal aplicação é no esclarecimento e diferenciação das DIP. O objetivo da realização da contagem diferencial no LBA de um doente com suspeita de DIP é a identificação ou exclusão de um padrão celular, que possa apoiar a probabilidade de um certo tipo de DIP ou ajudar a estreitar o diagnóstico da mesma. Estes achados incluem a eosinofilia pronunciada, na PE, as reações a fármacos, a linfocitose na sarcoidose, a PH, as reações pneumotóxicas, e as PII (12,13,17,18).

Para além da acessibilidade aos estudos celulares, com discriminação das celularidades total e diferencial, das populações e subpopulações linfocitárias, o LBA tem importância reconhecida no apoio ao diagnóstico, à interpretação fisiopatológica e à monitorização da evolução da resposta terapêutica em diversas patologias (8).

As alterações dos perfis celulares encontrados no LBA refletem transformações patológicas no parênquima pulmonar. A boa correlação entre o tipo de células recuperadas através do LBA e das amostras de BP, a boa tolerância ao procedimento e a relativa ausência de complicações são fatores que contribuíram para a expansão da sua utilização, revelando ser um método vantajoso, em detrimento de métodos invasivos como a BP e em situações em que estas estão contraindicadas (alterações da coagulação). É, também, útil para analisar a atividade de DIP podendo, em alguns casos, ser indicador de uma terapêutica sempre que a clínica, os exames imagiológicos e funcionais também revelem alterações compatíveis. É ferramenta de diagnóstico útil, cujos achados, devem ser interpretados no contexto clínico radiológico, com outros exames complementares de diagnóstico e pela história clínica do paciente (8,13,24,27,40).

O LBA é uma fonte de informação com inúmeras potencialidades. É um método valioso na recolha e pesquisa de células envolvidas nos mecanismos celulares e inflamatórios da patogénese das DIP. O uso rotineiro do LBA, na condução clínica desses processos, ainda não é

consensual, sendo este considerado inespecífico devido à sua capacidade limitada de previsão da patologia subjacente (fibrose *versus* inflamação), estadiamento da doença ou previsão da resposta à terapia. Contudo, para além destes fatores, o LBA fornece-nos informações valiosas sobre componentes celulares e não celulares. O LBA também pode ser usado em técnicas de imunohistoquímica, CF e microbiologia (8,9,13,27,41).

O estudo do LBA está indicado no diagnóstico de infeções pulmonares e infeções oportunistas em doentes imunocomprometidos, podendo, nesse caso, a sua eficácia diagnóstica atingir os 80%. É possível obter valores ainda mais altos se durante a broncofibroscopia, forem também executadas técnicas como escovados brônquicos ou BT. Além disso é, também, utilizado para diagnosticar pneumonia bacteriana, especialmente em pacientes ventilados (26).

A contagem celular diferencial, associada ao estudo imunofenotípico pela CF, principalmente nos casos em que exista um aumento de linfócitos, é um importante elemento de diagnóstico. Na análise do LBA por CF o método mais comum para identificação de linfócitos é a dispersão lateral (SS) e a expressão de CD45, com os subconjuntos de células T identificados por CD4+, CD8+, CD19+ e CD56+ (103).

A sarcoidose pulmonar é frequentemente caracterizada por uma razão $CD4 / CD8 \geq 3,5$ no LBA, tendo sido provado que este marcador de diagnóstico sofre variações dependentes do estadio da doença. Existem outros marcadores que foram estudados recentemente e que podem vir a ser introduzidos na rotina para tornar esta técnica mais informativa. Heron em 2008 e Mota e colaboradores em 2012 estudaram o potencial informativo da integrina CD103, expressa por linfócitos T pulmonares existentes no epitélio brônquico, e avaliaram o seu potencial como marcador de diagnóstico da sarcoidose (147,148).

O LBA associado à broncofibroscopia, veio revolucionar a pneumologia devido à baixa mortalidade e morbilidade decorrentes da técnica, tornando-a relativamente segura em doentes em que a biópsia e a escovagem estão contraindicadas. Para além do LBA existem outras técnicas recentes e complementares da broncofibroscopia tais como o sistema LIFE (*Lung Imaging Fluorescence Endoscope*), a terapêutica fotodinâmica, a broncoscopia virtual e a ecoendoscopia. O sistema baseia-se no princípio da autofluorescência. O grau de fluorescência tem uma boa correlação com as alterações displásicas, e a técnica pode detetar o cancro do pulmão em estadios precoces e muitas vezes passível de tratamento, até mesmo endoscópico. A terapêutica fotodinâmica consiste na utilização de substâncias fotossensibilizadoras, que são captadas por células tumorais, seguidas de ativação através de um laser a um determinado

comprimento de onda, que promove a destruição do tecido tumoral. A broncoscopia virtual é um método de avaliação das vias aéreas com base em imagens obtidas através de tomografia computadorizada helicoidal e processada via *software*, fornecendo imagens tridimensionais de alta resolução da árvore traqueobrônquica, simulando a broncofibroscopia.

A ecoendoscopia combina a ultrassonografia e a broncofibroscopia, expandindo a visão da broncoscopia às estruturas adjacentes que antes eram vistas apenas por sinais indiretos. A maior aplicação da ecoendoscopia é no diagnóstico das neoplasias do pulmão, uma vez que permitiu mostrar a extensão, a composição interna, a relação com as vias aéreas e com o mediastino, para além de exibir a extensão da infiltração, envolvimento da parede e invasão de estruturas mediastinais (149).

Os primeiros estudos do LBA de neoplasias pulmonares reportam casos de carcinoma bronquiolar, provavelmente devidos aos infiltrados difusos que manifestam (semelhantes aos da pneumonia). A biópsia por aspiração com agulha fina alcançou o papel principal no diagnóstico de tumores que aparecem como nódulos periféricos mas o LBA revelou-se importante no diagnóstico de tumores disseminados e difusos. Poletti e colaboradores (2007) forneceram uma excelente perspectiva sobre como a malignidade pode atingir os pulmões e como os biomarcadores do LBA podem ser úteis. A eficácia diagnóstica do LBA nas neoplasias pulmonares, com atingimento de pelo menos dois lobos, pode atingir uma média de 76% subindo para os 93% no caso dos carcinomas bronquioloalveolares (86).

A capacidade diagnóstica do LBA não se resume às neoplasias do pulmão e abrange, também, metástases pulmonares, a linfangite carcinomatosa e as neoplasias de origem hematológica (26).

O LBA é o método de escolha para diagnosticar as hemorragias pulmonares ocultas (que não cursam com hemoptises) e para eliminar outras doenças subjacentes, tais como infeções ou malignidades. É um método seguro, particularmente importante em doentes com distúrbios hemorrágicos, pela impossibilidade da realização de BP, devido ao risco de hemorragia (46). O diagnóstico de hemorragia pulmonar é feito com segurança através da observação de macrófagos com pigmento de ferro 48 horas após o sangramento, apontando fortemente para existência de hemorragia pulmonar (26).

Futuramente devem ser reunidos esforços pelos laboratórios a fim de serem desenvolvidas diretrizes para a reunião de critérios de representatividade e de exclusão de amostras. A viabilidade celular deverá ser sempre verificada para evitar gastos de tempo

desnecessários com processamento de amostras não viáveis e, desejável, senão mesmo imprescindível que cada centro ou laboratório disponha dos seus próprios controlos normais de forma a potenciar o valor diagnóstico e a utilidade clínica do LBA. A adoção de um procedimento padronizado irá contribuir para aumentar a probabilidade de identificação de diferenças clinicamente relevantes entre doenças e estadios de doença. Os Autores alertam para a necessidade de sensibilizar o clínico para a importância de mencionar a informação sobre a condição clínica do paciente, hábitos tabágicos e outros dados relevantes no pedido de análises que acompanha o LBA.

As novas ferramentas para análise de células do LBA permitiram a caracterização genética e a análise de proteínas de células e componentes solúveis, presentes no LBA, podendo oferecer um meio de diagnóstico preciso de formas específicas de DIP. Estas informações podem fornecer orientação na escolha de terapias eficazes, na monitorização da atividade da doença e na avaliação da eficácia específica dos fármacos. A análise de microensaios de DNA pode identificar e monitorizar padrões de expressão de um grande número de genes, sendo útil para a deteção de perfis de expressão que são específicos de determinados tipos de DIP. Também a análise do proteoma com eletroforese bidimensional em gel, a análise de imagem, e a espectrometria de massa podem permitir a identificação de padrões específicos de produtos dos genes cuja expressão permite a diferenciação das DIP (72).

Os perfis de proteínas no LBA tem mostrado diferenças entre FP, sarcoidose e PH. No futuro próximo, estes métodos podem proporcionar um meio de análise usando LBA, para conseguir diagnósticos de confiança de DIP específicas e contribuir para a seleção das terapias mais adequadas.

O LBA, em conjunto com broncofibroscopia, BT e outros métodos de amostragem das vias aéreas, tal como o condensado do ar exalado e os testes genéticos, contribuem para o esclarecimento do funcionamento normal do trato respiratório e para fornecer uma visão sobre a extensão da lesão e evolução da doença (72).

No transplante do pulmão e para a monitorização do recetor pós-transplante é realizada, no 2º ou 3º dia pós-transplante uma broncoscopia de vigilância com o objetivo remover secreções, avaliar anastomoses brônquicas, e realizar LBA e BT. O LBA é recolhido do lado correspondente ao pulmão transplantado. No caso de transplante bilateral coletar do lobo médio para o pulmão direito e da língua para o pulmão esquerdo. Este controlo tem também o objetivo de controlar a rejeição aguda ou a longo-prazo do enxerto pelo hospedeiro, e avaliar o possível

desenvolvimento de reações adversas como a bronquiolite obliterante (150,151). O LBA também é importante para a vigilância e detecção do desenvolvimento de colonização pulmonar e/ou de infecções oportunistas em pacientes transplantados e imunodeprimidos (108).

No campo da veterinária, o LBA também se tem mostrado promissor sendo eficaz no diagnóstico de angiostrongilose canina, especialmente nos casos em que o exame parasitológico das fezes se mostra negativo e os sinais apontam para a presença de parasitas (152). O LBA também tem aplicação clínica em equinos, na avaliação citológica de doenças inflamatórias e não-infecciosas pulmonares, bem como da hemorragia pulmonar induzida pelo exercício (153).

VII. Bibliografia

1. Prendergas, T. “Doença Pulmonar” in Lange: Fisiopatologia da Doença – Uma introdução à Medicina Clínica, 5ª Edição. São Paulo: McGraw-Hill; 2003.
2. Lopes C. Anatomia do Sistema Respiratório - Temas Atuais. Pneumologia Clínica. Volume I. Lisboa: A Bugalho de Almeida; 2005.
3. Netter H. Atlas de Anatomia Humana. 2ª Edição. Porto Alegre: Artmed; 2000.
4. Cordeiro J. Pneumologia Fundamental. 1ª edição. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian; 1995.
5. Goldman L, Austello D. Tratado de Medicina Interna. 23ª Edição. Rio de Janeiro: Elsevier; 2009.
6. Luís A. Doenças do Interstício Pulmonar. Medicina - Temas Atuais. Pneumologia Clínica. Volume IV. Lisboa: A Bugalho de Almeida; 2010.
7. Reynolds H. Bronchoalveolar Lavage – State of the art. Amer Rev Respir Dis 1987;135:250-263.
8. Reynolds H. Use of Bronchoalveolar Lavage in Humans – Past Necessity and Future Imperative. Lung 2000; 178:271-293.
9. Daniele R, Elias J, Epstein P, et al. Bronchoalveolar Lavage: role in the pathogenesis, diagnosis, and management of interstitial lung disease. Ann Intern Med 1985; 102:93-108.
10. Cantrell E, Warr G, Busbee D, et al. Induction of aryl hydrocarbon hydroxylase in human pulmonary alveolar macrophages by cigarette smoking. J Clinica Invest 1973; 52:1881-4.
11. Reynolds H, Newball H. Analysis of proteins and respiratory cells obtained from human lungs by bronchial lavage. J Lab Clin Med 1974; 84:559-73.
12. Reynolds H. Bronchoalveolar lavage – Obtaining Biological Specimens from the respiratory tract surface. Sarcoidosis vasculitis and diffuse Lung diseases 2008; 25:5-9.
13. Cordeiro R. Lavado broncoalveolar – O estado da arte. Revista portuguesa de Pneumologia 2000; VI (4):283-295.
14. Bergmann K, Kramer H, Wiesner B. Bronchoalveolar fluid – a new material in pulmonology. Erkrankungen Atmungsorgane 1981; 157:34-40.
15. European Society of Pneumology Task Group on BAL: Technical recommendations and guidelines for bronchoalveolar lavage (BAL). European Respiratory Journal 1989; 2:561-585.
16. UpToDate: <http://www.uptodate.com/contents/role-of-bronchoalveolar-lavage-in-diagnosis-of-interstitial-lung-disease>.

17. Taskinen I, Tukiainen P, Alitalo R, et al. Bronchoalveolar lavage. Cytological techniques and interpretation of the cellular profiles. *Pathol Ann* 1994; 29.
18. Davis G. Bronchoalveolar lavage in interstitial lung disease. *Semin Respir Crit Care Med* 1994; 15:37-60.
19. Ancochea J, Castella J, Llorente J, et al. Lavado broncoalveolar. Recomendaciones SEPAR. Barcelona 1998; Ediciones Doyma, SA
20. Haslam P, Baughman R. Report of ERS Task Force. Guidelines for measurement of acellular components and standartion of BAL (Editorial). *Eur Respir Journ* 1999; 14:245-248.
21. Pingleton S, Harrison G, Stechschulte D, et al. Effect of location, pH and temperature of instillate in broncoalveolar lavage in normal subjects. *Am Rev Respir Dis* 1983; 128:1035-1037.
22. The BAL Cooperative Group Steering Committee. Bronchoalveolar lavage constituents in healthy individuals, idiopathic pulmonary fibrosis, and selected comparation groups. *Am Rev respire Dis* 1990; 141: 169-202.
23. Baughman R. Technical aspects of bronchoalveolar lavage: Recommendations for a standard procedure. *Seminars in respiratory and critical care medicine* 2007; 28 (5):475-485.
24. Ward C, Walters E. Bronchoalveolar lavage (BAL). Critical evaluation of techniques. Human airway inflammation. *Methods in molecular medicine* 2001:31-59.
25. Helmers, R, Dayton, C, Floerchinger C, et al. Bronchoalveolar lavage in interstial lung disease: Effect of volume of fluid infused. *J Appl Physiol* 1989; 67:1443.
26. Silveira P, Palmares M, Delgado L. Lavagem Broncoalveolar: metodologia e aplicação clínica. *Revista Portuguesa de Pneumologia* 1997; III (2):155-178.
27. Wang K. Flexible bronchoscopy. Capítulo 11: Bronchoalveolar lavage. 2nd Edition. Blech Public 2000.
28. Rennard S, Ghafouri M, Thompson A, et al. Fractional processing of sequential bronchoalveolar lavage to separate bronchial and alveolar samples. *Am Rev Respir Dis* 1990;141:208-217.
29. Drent M, Jacobs J, Wagenaar S. Bronchoalveolar lavage. *European Respiratory Monografy* 2000.
30. Yeager H, Williams M, Beekman J, et al. Sarcoidosis: analysis of cells obtained by bronchial lavage. *Am Rev Respir Dis*. 1977; 166:951-954.
31. Low R, Davis G, Giancola M. Biochemical analyses of bronchoalveolar lavage fluid of healthy human volunteer smokers and nonsmokers. *Am Rev Respir Dis* 1978, 118:863-875.

32. Merrill W, Reynolds H. Bronchial lavage in inflammatory lung disease. *Clin Chest Med* 1983;4:71-83.
33. Velluti G, Capelli O, Lusuardi M, et al. Bronchoalveolar Lavage in the Normal Lung. *Respiration* 1984;46:1 – 7.
34. Laviolette M, Carreaux M, Coulombe R. Bronchoalveolar lavage (BAL) cell differentials on microscope glass cover. *Am Rev Respir Dis* 1988;138:451-457
35. Costabel U, Bross K, Reuler C. Alterations in immunoregulatory T-cells subsets in cigarette smokers: a phenotypic analysis of bronchoalveolar and blood lymphocytes. *Chest* 1986; 90: 39-44.
36. Etterson D, Jankowski M, Duncan P. Bronchoalveolar lavage in the normal volunteer subject. Technical aspects and intersubject variability. *Chest* 1988; 94:275-280.
37. Merchant R, Schwartz D, Helmers R, et al. Bronchoalveolar lavage cellularity. The distribution in normal volunteers. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146 (2):448-53.
38. Drent M, Mamf V, Gerritsen FA, et al. A computer program using BALF-analysis result as a diagnostic tool in interstitial lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:736-741.
39. Danila E, Jurgauskienė L, Norkūnienė J et al. BAL fluid cells in newly diagnosed pulmonary sarcoidosis with different clinical activity. *Upsala Journal of Medical Sciences* 2009; 114: 26-31
40. Ricomá J. Lavado Broncoalveolar: Interpretação no laboratório- Temas Actuais. *Pneumologia Clínica*. Volume II. Lisboa. A Bugalho de Almeida. 2006.
41. Correia I. Lavado Broncoalveolar - Temas Actuais. *Pneumologia Clínica*. Volume II. Lisboa. A Bugalho de Almeida. 2006.
42. Martinez J. Doenças intersticiais pulmonares. *Simpósio de Medicina*. Ribeirão Preto; 1998;7(31):247-256.
43. Travis W, King T, Bateman E, et al. – ATS/ERS international multidisciplinary consensus classification of idiopathic interstitial pneumonias. General Principles and recommendations. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165:277-304.
44. Serobe L. Doenças do interstício pulmonar - Temas Actuais. *Pneumologia Clínica*. Volume IV. Lisboa. A Bugalho de Almeida. 2010.
45. Meyer K, Raghu G, Baughman R. et al. An Official American Thoracic Society Clinical Practice Guideline: The Clinical Utility of Bronchoalveolar Lavage Cellular Analysis in Interstitial Lung Disease. *American Journal of Respiratory and Critical care medicine* 2012;185.

46. Klech H, Hutter C. Clinical Guidelines and indications for bronchoalveolar lavage (BAL): report of the European Society of Pneumology Task force on BAL. *Eur Respir J* 1990; 3:937-974.
47. Loureiro G, Loureiro C, Chieira C. Tratamento e prognóstico da sarcoidose. A propósito de um caso clínico. *Revista Portuguesa de Imunoalergologia*. XI. 2003.
48. Jones N, Mochizuki M. Sarcoidosis: Epidemiology and clinical features. *Ocul Immunol Inflamm*. 2010;18 (2):72-9.
49. Harrison W. Tratado de Medicina Interna. 17th Edition. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.
50. Costabel U, Guzman J. Bronchoalveolar lavage in interstitial lung diseases. *Curr Opinion Pulm Med*. 2001; 7:255-261.
51. Baughman R, Lower E. “Sarcoidose”, in Harrison: Medicina Interna, 17th Edition. Rio de Janeiro: McGraw-Hill; 2008.
52. Haslam P, Baughman RP. Report of ERS Task Force guidelines for measurement of acellular components and standardization of BAL (Editorial). *Eur Respir Journ* 1999; 14:245-248.
53. Costa M. Pneumologia na Prática Clínica. 2^a Edição. Lisboa. Faculdade de Medicina de Lisboa. 2006.
54. Moller D. Treatment of sarcoidosis – from a basic science point of view. *J Intern* 2003; 252:31-40.
55. Judson M. The etiologic agent of Sarcoidosis. *Chest*. 2003;124:6-8.
56. Drent M, Mansour K, Linssen C. Bronchoalveolar lavage in sarcoidosis. *Semin Respir Crit Care Med* 2007; 28(5): 486-495.
57. Rosa B. Sarcoidose, dúvidas ou certezas? Proposta de protocolos de abordagem ao doente [tese]. Faculdade de ciências da saúde: Universidade da Beira Interior; 2009.
58. Gasparin F, Fernandes L. Elementos básicos do diagnóstico e da terapêutica da sarcoidose: atualização. *Temas de reumatologia clínica* 2009;10(3).
59. Jindal S. Practical issues and challenges in the diagnosis and treatment of Pulmonary sarcoidosis. *Drugs* 2007; 67(1):17-26.
60. Rottoli P, Magi B, cianti R, et al. Carbonylated proteins in bronchoalveolar of patients with sarcoidosis, pulmonary fibrosis associated with systemic sclerosis and idiopathic pulmonary fibrosis. *Proteomics* 2005; 5:2612-2618.

61. Psathakis K, Papatheodorou G, Plataki M, et al. 8-isoprostane, a marker of oxidative stress, is increased in expired breath condensate of patients with pulmonary sarcoidosis. *Chest* 2004; 125:1005-1011.
62. Costa T, Rodrigues C, Arrobas A. Alveolite Alérgica Extrínseca com expressão imunológica atípica. *Revista Portuguesa de Pneumologia* 2009; Vol XV:2.
63. Wells S. Review: BAL in diffuse parenchymal lung disease. *European Respiratory Review* 2010;19:117.
64. Grunewald J, Eklund A. Sex-specific manifestations of Lofgren's syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175:40–44.
65. Parslow T, Stites D, Terr, A, et al. *Imunologia médica*. 10th Edition. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.
66. Machado M, Amorim A, Winck, J. Pneumonia eosinofílica aguda - Revisão clínica. *Revista Portuguesa de Pneumologia* 2002;VIII: 681-688.
67. Satter E, High W. Langerhans cell histiocytosis: a review of the current recommendations of the Histiocyte Society. *Pediatr Dermatol* 2008;25(3):291-5.
68. Hance A, Basset F, Saumon G, et al. Smoking and interstitial lung disease : the effect of cigarette smoking on the incidence of pulmonary histiocytosis X and sarcoidosis. *Ann NY Acad Sci* 1986;465: 643-656.
69. Takizawa Y, Taniuchi N, Ghazizadeh M et al. Bronchoalveolar fluid analysis provides diagnostic information on Pulmonary Langerhans Cell Histiocytosis. *J Nippon Med Sch* 2009; 76: 84-92.
70. Tazi, A. Adult pulmonary Langerhan's cell histiocytosis. *European Respiratory Journal* 2006.6; 1272-1285.
71. Pissara S, Rocha G, Azevedo I, et al. Proteinose Alveolar Congénita - *Acta Médica Portuguesa* 2005;18:163-168.
72. Reynolds, H. Bronchoalveolar lavage and other methods to define the human respiratory tract milieu in health and disease. *Lung* 2011;189 (2):87-99.
73. Lamblin C, Bergoin C, Saelens T et al. Interstitial lung diseases in collagen vascular diseases. *Eur Respir J* 2001;18 Suppl 32:69-80.
74. Kinder W, Shariat C, Collard R et al. Undifferentiated connective tissue disease-associated interstitial lung disease: changes in lung function. *Lung* 2010.188:143-149.

-
75. Kim E, Lee S, Johkoh T et al. Interstitial Lung Diseases Associated with Collagen Vascular Diseases: Radiologic and Histopathologic Findings. *RadioGraphics* 2002; 22:151-165.
 76. Wallaert B, Hoorelbeke A, Sibille Y, et al. The clinical role of bronchoalveolar lavage in collagen-vascular diseases. *Eur Respir Rev* 1992; 2:64-68.
 77. Tashkin P, Elashoff R, Clemens J et al. Cyclophosphamide versus placebo in scleroderma lung disease. *N Engl J Med* 2006.354:2655-2666.
 78. Oshimo S, Bonella F, Cui A, et al. Significance of bronchoalveolar lavage for the diagnosis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 179:1043-1047.
 79. Cottin V, Bonniaud P. Drug-induced infiltrative lung disease. *European Respiratory Monograph* 2009; 46:287-318.
 80. Camus P, Colby T. The lung in inflammatory bowel disease. *Eur Respir J* 2000; 15:5–10.
 81. Akoun G, Cadranel J, Milleron B et al. Bronchoalveolar lavage cell data in 19 patients with drug-associated pneumonitis (except amiodarone). *Chest* 1991; 99:98-104.
 82. Ho D, Tashkin D, Bein E et al. Pulmonary infiltrates with eosinophilia associated with tetracycline. *Chest* 1979; 76:33-36.
 83. Valcke Y, Pauwels R, Straeten M et al. Bronchoalveolar lavage in acute hypersensitivity pneumonitis caused by sulfasalazine. *Chest*.1987; 92:572-573.
 84. Friedrichs KH, Teschler H, Wick G et al. Asbestos content in bronchoalveolar lavage fluid. *Zentralbl Hyg Umweltmed* 1991; 192(4):336-43.
 85. Golde D, Drew L, Klein H, et al. Occult pulmonary hemorrhage in leukaemia. *Br Med J* 1975; 2:166-168.
 86. Poletti V, Poletti G, Murer B, et al. Bronchoalveolar lavage in malignancy. *Semin Respir Crit Care Med* 2007; 28:534-545.
 87. Zompi S, Couderc L, Cadranel J, et al. Clonality analysis of alveolar B lymphocytes contributes to the diagnostic strategy in clinical suspicion of pulmonary lymphoma. *Blood* 2004; 103:3208–3215.
 88. Poletti V, Romagna M, Gasponi A, et al. Bronchoalveolar lavage in the diagnosis of low-grade, MALT type, B-cell lymphoma in the lung. *Monaldi Arch Chest Dis* 1995; 50:191–194
 89. Poletti V, Romagna M, Allen K, et al. Bronchoalveolar lavage in the diagnosis of disseminated lung tumors. *Acta Cytol* 1995; 39:472–477.

90. Drent M, Wagenaar S, Mulder P, et al. Bronchoalveolar lavage fluid profiles in sarcoidosis, tuberculosis, and non- Hodgkin's and Hodgkin's disease: an evaluation of differences. *Chest* 1994; 105:514–519.
91. Bjermer L, Rust M, Heurlin N et al. The clinical use of bronchoalveolar lavage in patients with pulmonary infections. *Eur Respir Rev* 1992; 2:106-113.
92. Stover E, Zaman M, Hajdu SI. Bronchoalveolar lavage in the diagnosis of diffuse pulmonary infiltrates in the immunosuppressed host. *Ann Int Med.* 1984; 101: 1-7.
93. Braun J, Mehnert A, Dalhoff K et al. Different BALF Protein Composition in Normal Children and Adults. *Respiration* 1997; 64:350–35.
94. Bonella F, Ohshimo S, Bauer P, et al. Bronchoalveolar Lavage. *Eur Respir Mon* 2010; 48:59–72.
95. Arellano J, Viera P, Arcos M et al. Utilidad del lavado broncoalveolar en la enfermedad pulmonar intersticial difusa .Disponível.em:.<http://www.conganat.org/icongreso/conferencias/015/index.html>
96. Martin J. Guia de procedimientos – Lavado Broncoalveolar. *Neumosur: Revista de La Asociación de Neumólogos del sur* 1994;2.
97. Nicholson, J. Immunophenotyping of Lymphocytes by Flow Cytometry. In: Rose, NR; Hamilton, RG; Detrick, B. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. Washington DC: ASM Press 2002.137-139.
98. MacCoy J. Basic principles of flow citometry. *Hematology Oncology Clinics of North America*. 2002; 16:229-243.
99. Lorenzi T. *Manual de Hematologia: Propedêutica e clínica*. 4ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006.
100. Harris N, Jaffe E, Diebold J, et al. World Health Organization Classification of Neoplastic Diseases of Hematopoietic and Lymphoid Tissues: Report of the Clinical Advisory Committee Meeting. *J Clin Oncol*. 1999; 17(12):3835-3849.
101. Órfao A, Ruiz-Arguelles A, Lacombe F, et al. Flow cytometry: its applications in hematology. *Haematologica*. 1995;80: 69-81.
102. Rodrigues M. *Caracterização das Populações Linfocitárias em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistémico, e sua relação com a actividade da doença [tese]*. Faculdade de ciências: Universidade clássica de Lisboa. 2007.

103. Harbeck R. Immunophenotyping of Bronchoalveolar Lavage Lymphocytes. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 1998;271-277.
104. Xaubet A. Correlation of bronchoalveolar lavage and clinical findings in pulmonary asbestosis. *American Respiratory disease* 1986; 133:848-854.
105. Keogh B, Hunninghake G, Price D et al. Prognosis of established adult pulmonary histiocytosis X. *Am Rev Respir Dis* 1982; 125:92.
106. Peterson M, Nugent K, Jolles H, et al. Uniformity of bronchoalveolar lavage in patients with sarcoidosis. *Am Rev Respir Dis* 1988;137:719–784.
107. Teschler H, Konietzko N, Schoenfeld B, et al. Distribution of asbestos bodies in the human lung as determined by bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis* 1993;147:1211–1215.
108. Garcia JG, Wolven Rg, Garcia PL, et al. Assesment of interlobar variation of bronchoalveolar lavage cellular differentials in interstitial lung diseases. *Am Rev Respir Dis* 1986; 133:444-449.
109. Alto R. Síndrome de Churg-Strauss e Discussão de um caso clínico. [tese] Faculdade de ciências: Universidade da Beira Interior. 2008.
110. Helmers, A, Dayton S, Floerchinger, C, et al. Bronchoalveolar lavage in interstitial lung disease: Effect of volume of fluid infused. *J Appl Physiol* 1989; 67:1443.
111. Schildge J, Nagel C, Grun C. Bronchoalveolar lavage in interstitial lung diseases: Does the recovery rate affect the results? *Respiratory* 2007; 74:553-557.
112. Morales A. Factores que modifican celularidad del lavado broncoalveolar en enfermedad intersticial pulmonar. *Neumología e Cirugía de Tórax* 2009; 68(1).
113. Bernard J, Newman S. Sarcoidosis: immunology, rheumatic involvement and therapeutics. *Current Opinion in Rheumatology* 2001:84-91.
114. American Thoracic Society/European Respiratory Society. Joint Statement of the American thoracic society (ATS), The european Respiratory society (ERS) and the World Association of Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders (WASOG). *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:736–755.
115. Taniuchi N, Ghazizadeh M, Enomotoet T al. Evaluation off fractional analysis of bronchoalveolar lavage Combined with cellular citomorphological features. *International Journal of Medical Sciences* 2009; 6(1):1-8.
116. Smith R, El-Sad Wr, Lewis M et al. Correlation of broncholveolar lavage cell population with clinical severity of *Pneumocystis carinii* Pneumonia. *Chest*.1988; 93 (1):60-64.

117. Sadaghdar H, Huang H, Eden E. Correlation of bronchoalveolar lavage finding to severity of *Pneumocystis carinii* pneumonia in AIDS. Evidence for the development of high-permeability pulmonary edema. *Chest* 1992;102 (1):63-69.
118. Souza E. Pneumonias adquiridas na comunidade. *Pediatria moderna* 2010; 56(2):38-46.
119. Bang D, Emborg J, Elkjaer J et al. Independent risk of mechanical ventilation for AIDS-related *Pneumocystis carinii* associated with bronchoalveolar lavage neutrophilia. *Respiratory Medicine* 1998; 95(8).
120. Bento J, Botelho C, Moura C et al. Pneumonia eosinofilia crónica. *Acta Med Port* 2010; 23: 1133-1140.
121. Garcia J, Parhami N, Killam D et al. Bronchoalveolar lavage fluid evaluation in rheumatoid arthritis. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143:401-407.
122. Groen H, Aslander M, Bootsma H et al. Bronchoalveolar lavage cell analysis and lung function impairment with systemic lupus erythematosus. *Clin exp immunol.*1993;94:127-133.
123. Witt C, Eckert H, Brenke A et al. Bronchoalveolar lavage in systemic scleroderma and systemic lupus erythematosus – differential cell values and enzyme cytochemistry. *A Erkr Atmungsorgane* 1991; 177(3); 199-203.
124. Lyons D, Gautam A, Clark J et al. lymphocyte macrophage interactions: peripolexis of human alveolar macrophages. *European Respiratory Journal* 1992;5: 59-66.
125. Bauer R, Sawyer R, Daniloff E, et al. Bronchoalveolar lavage macrophage-lymphocyte clusters in granulomatous disease are linked to lymphocytosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2000;17(2):174-80.
126. Maarsseveen T, Groot J, Stam J et al. Peripolexis in alveolar sarcoidosis. *The American review of respiratory disease* 1993;147 (5):1259-63.
127. Welker L, Jorres RA, Costabel U, et al. Predictive value of BAL cell differentials in the diagnosis of interstitial lung diseases. *Eur Respir J* 2004; 24:1000–1006.
128. Drent M, van Velzen Blad H, Diamant M, et al. Relationship between presentation of sarcoidosis and T lymphocyte profile: a study in bronchoalveolar lavage fluid. *Chest* 1993; 104:795–800.
129. Drent M, Blad H, Diamant M, et al. Relationship between presentation of sarcoidosis and T lymphocyte profile: a study in bronchoalveolar lavage fluid. *Chest* 1993; 104:795–800.

130. Plancke A, Eklund A, Grunewald J. Inflammatory BAL fluid and serum parameters in HLA DR17 positive vs. DR17 negative with pulmonary sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc. Diffuse Lung Dis* 2001;18: 64-69.
131. Ziegenhagen MW, Rothe ME, Zissel G, et al. Exaggerated TNFalpha release of alveolar macrophages in corticosteroid resistant sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2002;19: 185–190.
132. Drent M, Jacobs J, de Vries J, et al. Does the cellular bronchoalveolar lavage fluid profile reflect the severity of sarcoidosis? *Eur Respir J* 1999; 13: 1338–1344.
133. Capelozzi V, Faludi E, Balthazar A, et al. Bronchoalveolar lavage Improves diagnostic accuracy in patients with diffuse lung disease. *Diagnostic Citopathology* 2013; 41:1-8.
134. Winterbauer R, Lammert J, Selland M, et al. Bronchoalveolar lavage cell populations in the diagnosis of Sarcoidosis. *Chest* 1993; 104:352-361.
135. Spagnolo, P., Richeldi L, Raghu G. The role of bronchoalveolar lavage cellular analysis in the diagnosis of interstitial lung diseases 2009. *Eur Respir Mon*:36-46.
136. Costabel U. CD4/CD8 ratios in bronchoalveolar lavage fluid:of value for diagnosing sarcoidosis? *Eur Respir J* 1997.10:2699-2700.
137. Drent M, Grutters JC, Mulder PG, et al. Is the different T helper cell activity in sarcoidosis and extrinsic allergic alveolitis also reflected by the cellular bronchoalveolar lavage fluid profile? *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 1997; 14:31–38.
138. Baughman R, Drent M. Role of bronchoalveolar lavage in interstitial lung disease. *Clin Chest Med* 2001; 22:331–341.
139. Kantrow S, Meyer K, Kidd P, et al. The CD4/CD8 ratio in BAL fluid is highly variable in sarcoidosis. *Eur Respir J* 1997;10: 2716–2721.
140. Danilla E, Norkūnienė J, Jurgauskienė L et al. Diagnostic role of BAL fluid CD4/CD8 ratio in different radiographic and clinical forms of pulmonary sarcoidosis. *The Clinical Respiratory Journal* 2009;3(4);214–22.
141. Boer, S. Wilsher M. Sarcoidosis. *Chron Respir Dis*, 2010;7:247-258.
142. Papiri S, Kollintza A, Karatza M et al. CD8+ T lymphocytes in bronchoalveolar lavage in idiopathic pulmonary fibrosis. *Journal of Inflammation* 2007; 4:14.
143. Fireman E, Vardinon N, Burke M, et al .Predictive value of response to treatment of T-lymphocyte subpopulation in idiopathic pulmonar fibrosis. *Eur Respir J*.1998; 11:706-711.

144. Zhao Q, Amir M, Rice W, et al.: Type II pneumocyte CD8+ T-cell interactions. Relationship between target cell cytotoxicity and activation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; 25:362-369.
145. Semenzato G, Bortoli E, Brunetta C, et al. Immunology and pathophysiology. *Eur Respir Mon* 2005; 32:49-64.
146. Grutters J. Sarcoidosis. *Eur Respir Mon* 2009; 46:126–154.
147. Heron M, Sliker W, Zanen P, et al. Evaluation of CD103 as a cellular marker for the diagnosis of pulmonary sarcoidosis. *Clin Immunol* 2008; 126(3):338-44.
148. Mota C, Mota P, Morais A et al. Diagnostic value of CD103 expression in bronchoalveolar lymphocytes in sarcoidosis. *Respir Med* 2012; 106(7):1014-20.
149. Endoscopia respiratória - Disponível em <http://www.ebronchoscopy.com/>
150. Belperio A, Weigt S, Fishbein M al. Chronic lung allograft rejection: mechanisms and therapy. *Proc Am Thorac Society*.2009; 6:108-21.
151. Muylem V, Knoop C. Estenne M. Early detection of chronic pulmonary allograft dysfunction by exhaled biomarkers. *Am J Respir crit Care Med*.2007;175:731-736.
152. Barçante P, Barçante T, Dias S et al.. A method to obtain *Angiostrongylus vasorum* first-stage larvae from dog feces. *Parasitol Res* 2003; 89(2):89-93.
153. Lessa D, Mori E, Viana E. et al. Lavado broncoalveolar em equinos: revisão de literatura. Parte 1: Técnicas de colheita. *Arq. ciên. vet. Zool* 2005; 8 (2): 213-217.